



**Soraia Cristina
Marques Caetano**

**O Yap1 no stress causado pelo excesso de cobalto
em *S. cerevisiae***



**Soraia Cristina
Marques Caetano**

**O Yap1 no stress causado pelo excesso de cobalto
em *S. cerevisiae***

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia, realizada sob a orientação científica da Professora Doutora Claudina Amélia Marques Rodrigues-Pousada, no Instituto de Tecnologia Química e Biológica da Universidade Nova de Lisboa e co-orientação do Professor Doutor Manuel António da Silva Santos, Professor Associado do departamento de Biologia da Universidade de Aveiro.

“It is not the strongest of the species that survives, or the most intelligent. It is the one that is the most adaptable to change.”

Charles Darwin

O júri

Presidente

Professor Doutora Etelvina Maria de Almeida Paula Figueira
Professora Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Professor Doutor Vítor Manuel Vieira da Costa
Professor Associado do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto

Professora Doutora Claudina Rodrigues-Pousada
Professora Catedrática da Universidade Nova de Lisboa

Professor Doutor Manuel António da Silva Santos
Professor Associado do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Agradecimentos

Gostaria de agradecer em primeiro à Professora Doutora Claudina Rodrigues-Pousada por todo o rigor e conhecimento científico demonstrado no decorrer deste estudo, pela orientação, amizade e por ter motivado o meu gosto pela ciência.

Ao Professor Doutor Manuel Santos gostaria de agradecer a disponibilidade para ser co-orientador da presente dissertação.

À Doutora Catarina Pimentel agradeço a amizade, a formação de carácter, a ajuda e a tenacidade com que lidou comigo.

Aos meus pais agradeço por terem tornado esta meta alcançável, por todos os esforços que foram necessários e pelo amor que sei que sentem.

Às minhas irmãs, Ana e Beatriz, agradeço a compreensão, a ajuda, a constante motivação e a cumplicidade que possuímos entre nós.

Ao Rafael agradeço o carinho e a compreensão nas alturas mais tensas. Penso que sem ele não teria conseguido ultrapassar metade dos desafios e dificuldades.

Agradeço à Inês e à Edna, que mesmo longe conseguiram manter-se sempre perto.

Agradeço à Ana Rita Silva, a amizade e as viagens de carro que nos ajudaram, durante este ano, a manter a sanidade mental.

Agradeço aos meus colegas de laboratório. À Ana Raposo pela paciência e as confidências trocadas. À Catarina Amaral, sempre discreta, pelo companheirismo. À Cristina pelo seu espírito alegre, a sua maneira de ver a vida e amizade. À Regina pela amizade e o sorriso que a caracteriza. À Filipa pelo seu jeito de menina que alegra o laboratório. Ao Fábio por ser tão alegre e conversador. À Liliana e à Cátia pela sua amizade e por serem frontais sempre que necessário. À Rita pelos pormenores e histórias que nos divertem.

palavras-chave

Saccharomyces cerevisiae, Yap1, resposta ao stress, cobalto, GSH, stress oxidativo

resumo

A capacidade dos organismos em alterar os seus padrões de expressão de genes em resposta a perturbações do meio ambiente é essencial para a sua viabilidade. Neste trabalho, utilizando *Saccharomyces cerevisiae* como organismo eucariota modelo, foi estudada a relevância do factor de transcrição da família Yap, o Yap1, na desintoxicação do excesso de cobalto. Os resultados obtidos neste trabalho demonstram que, após a incubação das células com cobalto, o factor de transcrição Yap1 é acumulado no núcleo, através de um mecanismo independente de Orp1/Gpx3. Verificámos que o cobalto tem a capacidade de ligar-se directamente ao Yap1, sugerindo que, à semelhança do que acontece com outros metais, seja este o mecanismo de retenção nuclear após o stress. Confirmámos que uma vez no núcleo, o Yap1 medeia a indução de genes envolvidos na regulação do stress oxidativo em levedura (tais como *GPX2*, *SOD1*, *TRR1* e *TRX2*) e constatámos que a presença de cobalto aumenta os níveis de carbonilação das proteínas, sendo esse aumento mais acentuado na ausência de Yap1. Verificámos ainda que os níveis de cobalto estão levemente diminuídos no mutante *yap1* ao contrário do ferro que está em concentrações mais elevadas neste mutante relativamente à estirpe selvagem, quer na presença como na ausência de cobalto. Este facto leva-nos a propor que o cobalto altere a homeostase do ferro e que em consequência, conjuntamente com a diminuição das defesas anti-oxidantes, gere stress oxidativo.

Foi descrito que a glutatona (GSH) é importante na homeostase do ferro e o excesso de cobalto leva ao aumento dos níveis de ferro intracelulares. Verificámos não só que a expressão de *GSH1* está diminuída aos 30 minutos de tratamento do mutante *yap1* com cobalto mas também que a adição de GSH faz recuperar os fenótipos de crescimento na presença deste metal.

Finalmente apresentámos um modelo de acção do factor Yap1 no stress provocado pelo cobalto.

keywords

Saccharomyces cerevisiae, Yap1, stress response, cobalt, GSH, oxidative stress

Abstract

The ability of organisms to reprogram gene expression in response to changes in the environment is essential for their viability. In this work, using *Saccharomyces cerevisiae* as a eukaryotic model organism, we studied the relevance of the transcription factor, Yap1, in the detoxification of cobalt excess. The results here reported show that after incubation of cells with cobalt, Yap1 accumulates in the nucleus, through a mechanism independent of the peroxidase Orp1/Gpx3. We found that cobalt has the ability to directly bind to Yap1, suggesting that this is the mechanism for its nuclear retention after cobalt treatment. We confirmed that, once in the nucleus, Yap1 mediates the induction of genes involved in the regulation of oxidative stress in yeast (such as *GPX2*, *SOD1*, *TRX2* and *TRR1*). Moreover, we found that the presence of cobalt increases the levels of protein carbonylation, being the damage more pronounced in the absence of Yap1. It was also found that cobalt levels are slightly decreased in the *yap1* mutant. In contrast, the iron concentration is higher in this mutant than in the wild type, in the presence and absence of cobalt. This led us to propose that the cobalt alters iron homeostasis and in consequence generate oxidative stress.

It was reported that glutathione (GSH) is important in the homeostasis of iron. As the excess of cobalt leads to increased levels of intracellular iron, we found not only that in the *yap1* mutant *GSH1* expression is decreased after 30 minutes of treatment with cobalt but also, the addition of GSH can recover the growth phenotypes in the presence of this metal.

. Finally we present a working model of the transcription factor Yap1 in stress caused by cobalt.

Símbolos e abreviaturas

AP-1	Proteína activadora 1
bZip	Domínio básico de ligação ao DNA (“Basic region leucine zipper”)
cCRD	Domínio C-terminal rico em cisteínas
CoSO₄	Sulfato de cobalto
DABCO	1,4-diazabicyclo[2.2.2]octano
DAPI	4',6'-diamidino-2-fenilindole, diidroclorido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
OD₆₀₀	Densidade óptica a 600 nanómetros
EDTA	Ácido etilenodiaminatetracético
GFP	Proteína de fluorescência verde
GRXs	Glutarredoxinas
GSH	Glutationa
GSH1	gene que codifica para a enzima γ -glutamylcisteína sintase
HSE	Elemento de choque térmico
HSF	Factor de choque térmico
Hsp	Proteína de choque térmico
kDa	kiloDalton
M	Molar
mM	Mili Molar
m/V	Massa por volume
NADPH	Resíduo dinucleótido adenina nicotinamida (forma reduzida)
nCRD	Domínio N-terminal rico em cisteínas
NES	Sinal de exportação do núcleo (“nuclear export signal”)
NLS	Sinal de localização nuclear (“nuclear localization signal”)
nm	Nanómetros
°C	Graus Celsius
ORF	Grelha de leitura em fase aberta (“Open reading frame”)
Pb	Pares de bases
PBS	Sal de fosfato tamponizado
PCR	Reacção em cadeia da Polimerase
PKA	Proteína cinase A
PEG	Polietilenoglicol
PMSF	“Phenylmethanesulfonyl fluoride”
PSA	Persulfato de amónia
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	Espécies de oxigénio reactivas
SC	Meio completo
SDS	Sulfato dodecil sódio
SDS-PAGE	SDS-electroforese gel poliacrilamida
SOD	Superóxido dismutase
STRE	Elemento de resposta ao stress
TCA	Ácido tricloroacético
TE	Tris-EDTA
TEMED	N',N',N',N'-tetrametilenodiamida
TRX	Tiorredoxina
V	Volt

v/v	Volume por volume
Yap	Proteína Activadora de Levedura
Ycf1	Factor de Cádmio na Levedura
YPD	Glucose-Peptona-Extracto de levedura
WT	Estirpe selvagem (“wild type”)
YRE	Elemento de reconhecimento yap
µL	Microlitro

Símbolos dos resíduos de aminoácidos

Ala	alanina	Met	metionina
Asn	asparagina	Pro	prolina
Cys	cisteína	Gln	glutamina
Asp	ácido aspártico	Arg	arginina
Glu	ácido glutâmico	Ser	serina
Phe	fenilalanina	Thr	treonina
Gly	glicina	Val	valina
His	histidina	Trp	triptofano
Ile	isoleucina	Tyr	tirosina
Lys	lisina	Glx	glutamato
Leu	leucina		

Símbolos das bases de nucleótidos

A	adenina
C	citosa
G	guanina
T	timina

Legenda:

YAP - gene

yap -gene *YAP* disrompido

Yap - proteína

Índice

Capítulo 1 Introdução.....	1
1.1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> como organismo modelo na resposta ao stress celular.....	3
1.2. Factores de transcrição envolvidos no combate ao stress	5
1.2.1. A Família Yap.....	6
1.2.1.1. O Yap1 e o stress oxidativo.....	9
1.3. Cobalto e suas aplicações.....	12
1.4. Toxicidade provocada pelo excesso de cobalto	13
1.4.1. O excesso de cobalto em levedura	14
Capítulo 2 Material e Métodos.....	4
2.1. Estirpes e condições de crescimento	19
2.2. Manipulação de DNA e plasmídeos.....	20
2.3. Preparação de células competentes de levedura.....	20
2.4. Transformação de células competentes de levedura	20
2.5. Preparação das amostras de RNA e análise por Real-time PCR.....	21
2.6. Análise de células expressando as proteínas de fusão GFP-Yap1 e GFP-cCRDYap1	22
2.7. Preparação dos extractos proteicos e análise por Western Blot	22
2.8. Preparação das amostras e análise por OxyBlot.....	24
2.9. Preparação das amostras para análise por emissão atómica.....	24
2.10. Preparação das amostras para análise por HPLC	25
Capítulo 3 Resultados e Discussão.....	27
3.1. O Yap1 é necessário na resposta ao stress provocado por cobalto.....	29
3.2. O Yap1 influencia os níveis intracelulares de cobalto e ferro.....	31
3.3. O excesso de cobalto direcciona o Yap1 para o núcleo	32
3.4. Cobalto gera stress oxidativo acentuado na ausência de Yap1	34
3.5. A regulação da expressão do gene GSH1 pelo Yap1 é importante para a tolerância da célula ao cobalto.....	38
Capítulo 4 Conclusões e Perspectivas	43
Referências bibliográficas	49

Índice de Figuras

Capítulo 1

Figura 1.1 Estrutura do domínio b-ZIP do factor de transcrição Gcn4 ligado ao DNA.6

Figura 1.2 Características estruturais da família Yap. Na parte superior da figura, encontra-se o alinhamento das sequências dos domínios b-ZIP da família de factores de transcrição Yap e do factor Gcn4. Na parte inferior da figura encontra-se um esquema das posições dos domínios estruturalmente relevantes, tais como os domínios ricos em cisteínas (n-CRD e c-CRD) e o sinal de exportação do núcleo (NES) (Rodrigues-Pousada *et al.*, 2010).7

Figura 1.3 Potencial interacção entre os diferentes membros da família Yap (adaptado de (Rodrigues-Pousada, 2010), com modificações).8

Figura 1.4 Representação esquemática das vias de stress oxidativo e respectivas defesas na célula eucarionte: **(A)** danos no DNA da mitocôndria e núcleo; **(B)** peroxidação lipídica; **(C)** oxidação proteica; **(D)** inactivação de enzimas específicas; **(E)** geração de ROS na membrana mitocôndrial interna; **(F)** vias TRX e GSH essenciais na defesa da célula (adaptado de (Valentine, 1998), com modificações).9

Figura 1.5 Representação esquemática das formas de acumulação nuclear e consequente activação do factor de transcrição Yap1.10

Capítulo 3

Figura 3.1 Tolerância do mutante *yap1* ao stress provocado por sulfato de cobalto (CoSO₄). **(A)** Crescimento da estirpe selvagem (WT) e mutante *yap1* (*yap1*) durante 20h, nas concentrações de CoSO₄ indicadas. **(B)** Curva de crescimento das estirpes selvagem (WT) e mutante *yap1* (*yap1*) na ausência ou presença de 2mM de CoSO₄. **(C)** Crescimento das estirpes selvagem (WT), mutante *yap1* (*yap1*<vector>) e mutante *yap1* transformado com o plasmídeo contendo o gene *YAP1* (*yap1*<*YAP1*>), durante 48 horas em meio sintético completo sólido suplementado com 2mM e 2,5 mM de CoSO₄.29

Figura 3.2 Conteúdo intracelular dos iões cobalto e ferro. As estirpes selvagem (WT) e mutante <i>yap1</i> (<i>yap1</i>) foram crescidas durante 20 horas na ausência (fisiológico) e presença de 2mM de CoSO ₄	31
Figura 3.3 Distribuição celular do factor de transcrição Yap1 (A) Localização da construção GFP-Yap1 em condições normais de crescimento (-Co) ou após o tratamento durante 10, 60, 90 minutos com 2mM de CoSO ₄ . (B) Localização celular da construção GFP-cCRDYap1na estirpe selvagem e da construção GFP-Yap1 no mutante <i>orp1</i> , em condições fisiológicas e após 60 minutos de tratamento com 2mM de CoSO ₄	32
Figura 3.4 O cobalto liga-se directamente aos resíduos de cisteína do Yap1. A estirpe selvagem foi transformada com Yap1-cMyc. Células em fase exponencial de crescimento foram tratadas com 2mM de CoSO ₄ durante 30 minutos. Os extractos proteicos foram posteriormente incubados com AMS, analisados por Western blot com anticorpo anti-cMyc e comparados com extractos proteicos de condições controlo (sem stress e com AMS; sem stress e sem AMS). Os traços brancos indicam o eixo de simetria horizontal das bandas.	33
Figura 3.5 A dependência de vários genes do stress oxidativo do factor de transcrição Yap1, aumenta após o stress gerado por excesso de cobalto. Culturas de células da estirpe selvagem e mutante foram tratadas com CoSO ₄ durante os tempos indicados. Os RNAs foram extraídos e analisados por qRT-PCR com primers específicos para os genes (A) <i>GPX2</i> , (B) <i>SOD1</i> , (C) <i>TRR1</i> (D) <i>TRX2</i>	35
Figura 3.6 Detecção imunológica da carbonilação de proteínas nas estirpes de <i>S. cerevisiae</i> selvagem e mutante <i>yap1</i> após tratamento com CoSO ₄ . A proteína Pgk1 foi utilizada como controlo de quantidade.	37
Figura 3.7 A dependência do gene <i>GSH1</i> do factor de transcrição Yap1. Culturas de células da estirpe selvagem e mutante <i>yap1</i> foram tratadas com CoSO ₄ durante os tempos indicados. Os RNAs foram extraídos e analisados por qRT-PCR com primers específicos para o gene <i>GSH1</i>	39
Figura 3.8 A adição de GSH exógeno ao meio de cultura alivia a toxicidade do cobalto. As estirpes selvagem e mutante <i>yap1</i> cresceram em meio sólido completo sintético suplementado com 2mM de CoSO ₄ e também na presença de 200 ou 300 µM de GSH. O crescimento das células foi registado depois de 24 e 72h de incubação a 30°C.	41

Capítulo 4

Figura 4.1 Representação esquemática do possível modelo de acção do Yap1 no controlo dos danos provocados por cobalto.	46
--	----

Índice de Tabelas

Capítulo 2

Tabela 2.1 Estirpes de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> utilizadas no estudo.	19
Tablea 2.2 Plasmídeos utilizados no presente trabalho.	20
Tabela 2.3 Oligonucleótidos necessários para a reacção de qRT-PCR.	21

Capítulo 3

Tabela 3.1 Genes envolvidos na resposta ao stress oxidativo que exibem expressão alterada no mutante <i>yap1</i> , após 60 minutos de tratamento com 2mM de CoSO ₄ (Pimentel <i>et al</i> , resultados não publicados).	34
Tabela 3.2 Conteúdo intracelular de GSH e GSSG após 60 minutos de exposição a 2mM de CoSO ₄	39

Capítulo 1

Introdução

1.1. *Saccharomyces cerevisiae* como organismo modelo na resposta ao stress celular

A levedura *Saccharomyces cerevisiae*, vulgarmente designada por fermento de padreiro, é um organismo eucariota unicelular, não patogénico, de fácil manipulação genética e, apesar de simples, conserva as funções celulares básicas dos organismos eucariotas superiores. Assim, devido às vantagens apresentadas por este microrganismo, *S.cerevisiae* é um organismo modelo amplamente utilizado em estudos bioquímicos, celulares e moleculares (Forsburg, 2001; Sherman, 2002). Esta levedura possui um tempo de geração curto (em condições óptimas, inferior a duas horas) e o seu crescimento e manutenção não são muito dispendiosos o que permite a recolha de material biológico em quantidades suficientes para estudos posteriores (Altmann *et al.*, 2007).

A levedura foi o primeiro organismo eucariota com o genoma totalmente sequenciado e disponível para consulta numa base de dados pública, a SGD – *Saccharomyces* Genome Database (<http://www.yeastgenome.org/>). O seu genoma com 12,8 Mb está dividido em 16 cromossomas contendo cerca de 6000 genes (Dujon *et al.*, 1994). A fácil manipulação genética de *S. cerevisiae* permitiu que este microrganismo fosse o primeiro eucariota a ser transformado com plasmídeos (Forsburg, 2001). É um organismo em que a recombinação homóloga é eficiente, o que permite a eliminação precisa de genes do seu genoma, possibilitando assim a existência de uma colecção de mutantes para todos os genes disponível comercialmente. As estirpes de levedura utilizadas em laboratório são estáveis tanto no estado haplóide como diplóide (Sherman, 2002).

Outra particularidade de *Saccharomyces cerevisiae* reside no facto de ser um organismo anaeróbio facultativo, podendo satisfazer os seus requisitos de energia com ATP gerado através da fermentação ou da respiração celular, utilizando preferencialmente como fonte de carbono a glucose e a frutose (Altmann *et al.*, 2007).

Um dos maiores desafios de todos os organismos consiste em superar todas as flutuações das condições externas, mantendo a sua homeostase. Muitas vezes, mudanças abruptas no ambiente externo perturbam as funções celulares, podendo mesmo influenciar o bom funcionamento da célula e até conduzir à morte celular (Gasch and Werner-Washburne, 2002). A levedura *Saccharomyces cerevisiae*, à semelhança de outros

Capítulo 1 Introdução

organismos, desenvolveu mecanismos de resposta aos efeitos provocados pelas alterações do meio envolvente. Nessa resposta, são desencadeadas vias de transdução de sinal que culminam na reprogramação genética e consequente diminuição da expressão de genes “housekeeping” e aumento da expressão de genes relacionados com a resposta ao stress. As proteínas “chaperones” moleculares, também designadas por “heat shock proteins” (HSPs), desempenham um papel preponderante na resposta primária ao stress (Lindquist and Craig, 1988). Porém, estas proteínas são também importantes para a viabilidade celular em condições normais de crescimento, desempenhando um importante papel em processos celulares, tais como, a replicação e transcrição de DNA, tradução, “folding” proteico, transporte membranar e divisão celular (Mosser and Morimoto, 2004).

Nas respostas primária e específica aos diferentes tipos de stress são necessárias proteínas responsáveis pela activação da transcrição dos genes envolvidos nestas vias, sendo, por este motivo, alguns factores de transcrição decisivos na sobrevivência e adaptação da célula às constantes mudanças ambientais a que estão sujeitas.

1.2. Factores de transcrição envolvidos no combate ao stress

Na levedura *S. cerevisiae* existem vários factores de transcrição envolvidos na resposta ao stress celular. Como referido anteriormente, as “chaperones” moleculares (HSP) actuam na resposta primária da célula ao stress. A transcrição dos mensageiros codificando para estas proteínas, na levedura, é regulada pelo factor de transcrição designado “Heat Shock Factor” (HSF1). Todos os genes regulados pelo HSF1 possuem na sua zona promotora uma sequência de cinco pares de bases designada “heat shock element” (HSE; nGAAn) (Rodrigues-Pousada *et al.*, 2004).

Um mecanismo de regulação genética independente dos HSFs, mas que continua a responder a um variado número de diferentes condições de stress, compreende os factores de transcrição Msn2 e Msn4. Estas proteínas estão envolvidas na regulação de genes de resposta que contenham o “Stress Responsive Element” (STRE; CCCCT) na sua região promotora. A acumulação destes factores de transcrição no núcleo é regulada negativamente pelos níveis de cAMP e pela actividade da proteína cinase A (PKA) (Wemmie *et al.*, 1994). Assim, quando os níveis de actividade de PKA estão baixos observa-se uma acumulação de Msn2/4 no núcleo e quando os níveis são elevados estes acumulam-se no citoplasma não sendo activados os genes envolvidos na resposta ao stress (Nevitt and Rodrigues-Pousada, 2006).

Outra família de factores de transcrição envolvida na resposta da célula a diferentes tipos de stress é a família Yap (Yeast Activator Protein ou AP-1 “like proteins”). Sendo um dos membros desta família, o Yap1, objecto central do trabalho desenvolvido no âmbito desta dissertação de Mestrado, concentrar-nos-emos nesta família e, em particular, no factor de transcrição Yap1.

1.2.1. A Família Yap

A família de factores de transcrição Yap é constituída por oito membros (Yap1-Yap8) que possuem um domínio conservado b-ZIP de ligação ao DNA (Rodrigues-Pousada *et al.*, 2010).

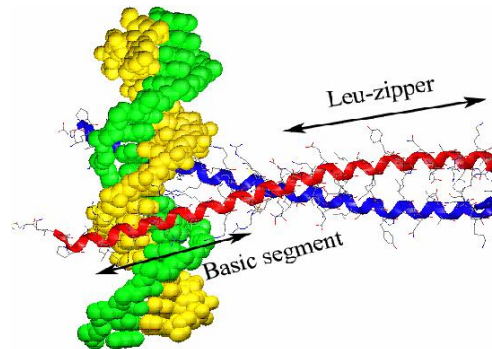


Figura 1.1 Estrutura do domínio b-ZIP do factor de transcrição Gcn4 ligado ao DNA.

Os eucariontes superiores bem como a levedura contêm factores de transcrição AP-1 que estimulam a expressão de classes específicas de genes de resposta ao stress. Estes factores de transcrição possuem um domínio b-ZIP constituído por um “zipper” que medeia a sua dimerização e uma região básica adjacente que interage especificamente com sequências de DNA (Figura 1.1) (TTAC/GTAA) (Fernandes *et al.*, 1997). Todas as proteínas da família Yap possuem similaridade significativa com a proteína “yeast AP-1” convencional e bem caracterizada, a proteína Gcn4, que se liga à sequência TGACTCA no DNA (Figura 1.1) (Rodrigues-Pousada *et al.*, 2010). Este factor de transcrição está envolvido na regulação de mais de trinta genes relacionados com a biossíntese de aminoácidos e nucleótidos, genes de várias aminoacil-tRNA-sintetases, entre outros (Coleman *et al.*, 1997; Hinnebusch, 2005). Apesar das semelhanças entre os locais de ligação ao DNA (Figura 1.2), pequenas diferenças nessa região poderão ser a chave para as diferentes especificidades exibidas por estes factores. No caso das proteínas Yap1- Yap4 e Yap6, o seu domínio de ligação ao DNA reconhece a sequência TTAG/CTAA, o qual difere do local de ligação de Gcn4 (Rodrigues-Pousada *et al.*, 2005). O local de ligação do factor de transcrição Yap5 foi caracterizado como TTACTAA (Tan *et al.*, 2008). No caso dos factores Yap3 e 7 ainda não foram identificados os seus locais de ligação ao DNA. (Rodrigues-Pousada *et al.*, 2010). No caso da proteína Yap8, foi identificada uma

sequência de 13 pares de bases específica: TGATTAATAATCA (Amaral *et al*, resultados não publicados).

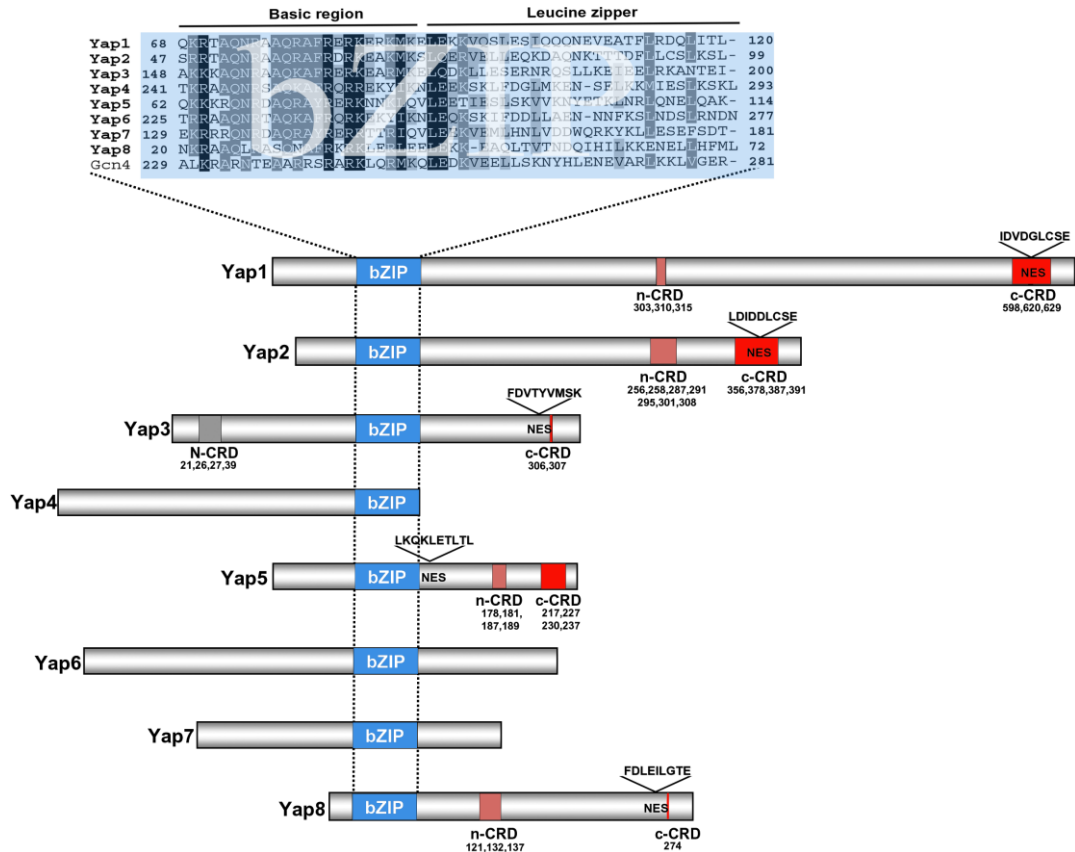


Figura 1.2 Características estruturais da família Yap. Na parte superior da figura, encontra-se o alinhamento das sequências dos domínios b-ZIP da família de factores de transcrição Yap e do factor Gcn4. Na parte inferior da figura encontra-se um esquema das posições dos domínios estruturalmente relevantes, tais como os domínios ricos em cisteínas (n-CRD e c-CRD) e o sinal de exportação do núcleo (NES) (Rodrigues-Pousada *et al.*, 2010).

Vários estudos têm vindo a demonstrar que a família Yap está envolvida na resposta a diferentes tipos de stress. O membro Yap1 está relacionado com a resposta ao stress oxidativo e stress provocado por metais e metalóides, o Yap2 com a resposta ao stress provocado por cádmio e outros oxidantes, o Yap4 e Yap6 estão relacionados com a resposta ao stress osmótico, Yap5 relacionado com o metabolismo de ferro e o Yap8 relacionado com a resposta ao stress provocado por composto arsénicos. A função dos membros Yap3 e Yap7 permanece, no entanto, por elucidar. Sabe-se também que dois ou mais membros da família Yap podem actuar simultaneamente na resposta ao mesmo tipo de stress (Figura 1.3) (Rodrigues-Pousada *et al.*, 2010).

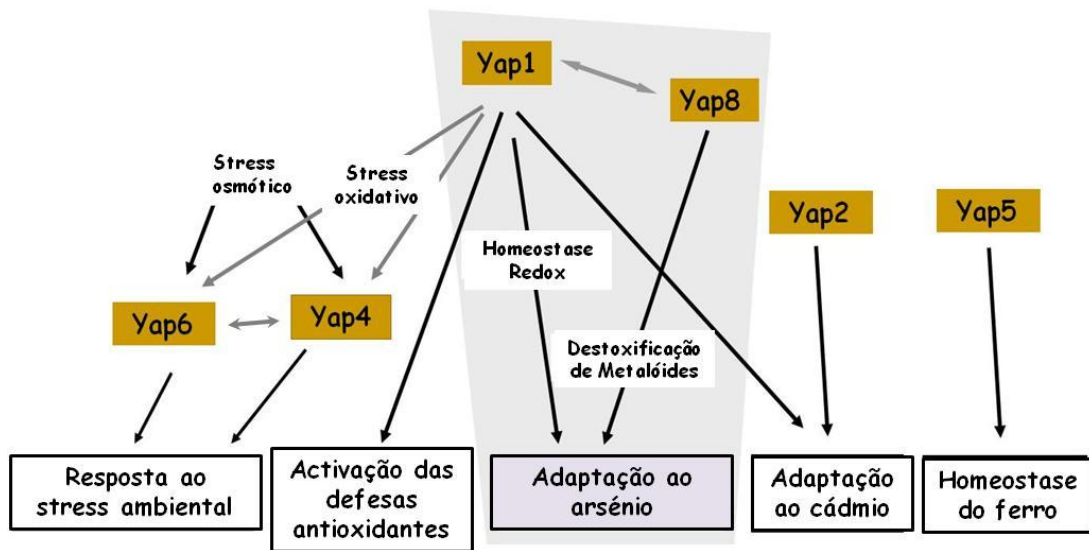


Figura 1.3 Potencial interacção entre os diferentes membros da família Yap (adaptado de (Rodrigues-Pousada, 2010), com modificações).

1.2.1.1. O Yap1 e o stress oxidativo

A presença de oxigénio nas células gera stress oxidativo (Figura 1.4 A, B, C, D). Em levedura, a cadeia mitocondrial de transporte de electrões é a maior fonte intracelular de espécies reactivas de oxigénio (ROS) em condições fisiológicas (Herrero *et al.*, 2008) (Figura 1.4 E).

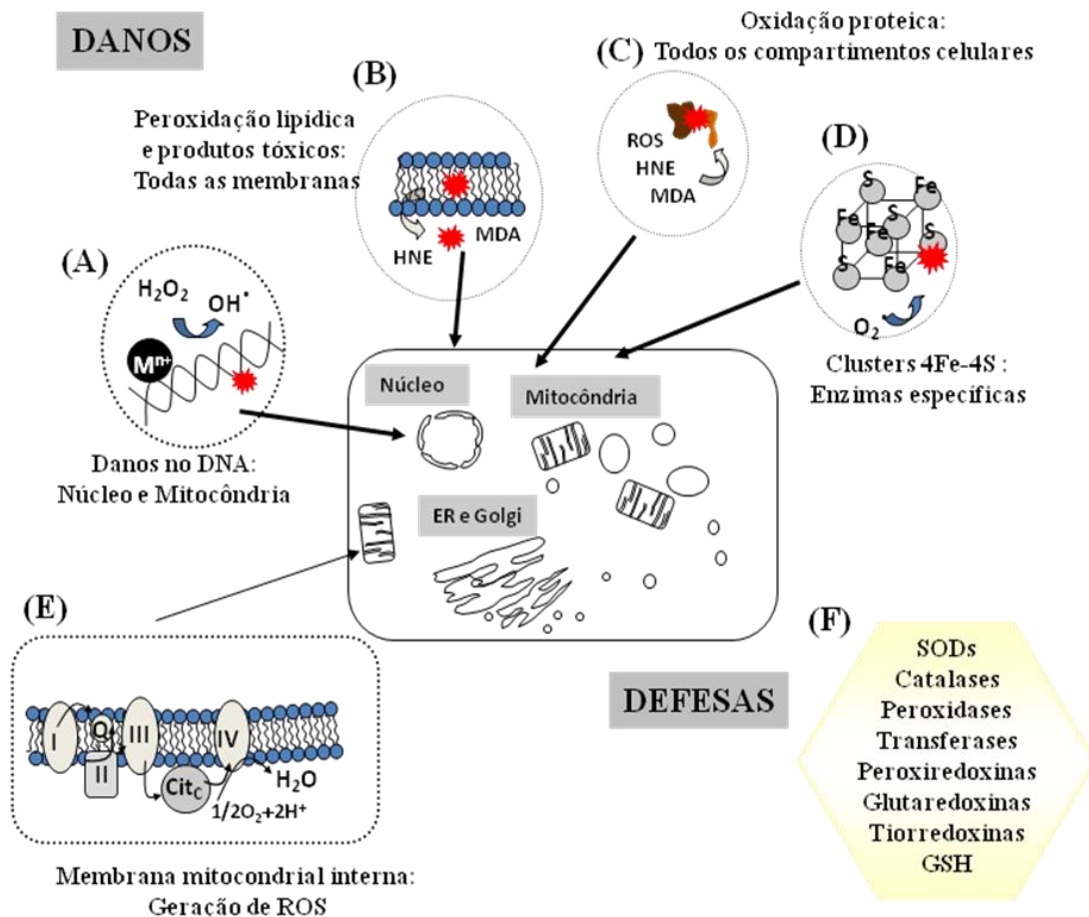


Figura 1.4 Representação esquemática das vias de stress oxidativo e respectivas defesas na célula eucarionte: (A) danos no DNA da mitocôndria e núcleo; (B) peroxidação lipídica (HNE- 4-hidroxi-2-nonenal; MDA- Malondialdeído); (C) oxidação proteica (ROS-Espécies Reactivas de Oxigénio); (D) inativação de enzimas específicas; (E) geração de ROS na membrana mitocondrial interna; (F) vias TRX e GSH essenciais na defesa da célula (adaptado de (Valentine, 1998), com modificações).

A célula possui vias enzimáticas de defesa contra os vários danos causados pelo stress oxidativo (Figura 1.4 F). Assim, existe um grupo de enzimas que destoxificam directamente os ROS enquanto, outro grupo, actua como protector de grupos tiol das proteínas, mantendo e monitorizando o equilíbrio redox na célula. O primeiro grupo é

constituído por enzimas antioxidantes tais como as superóxido dismutases (SOD), catalases e peroxidases. Do grupo regulador do equilíbrio redox na célula fazem parte as tiorredoxina (TRX) e glutaredoxina (GSH) (Herrero *et al.*, 2008). Em *S. cerevisiae*, o regulador central da resposta ao stress oxidativo é o factor de transcrição Yap1. Alguns dos genes dependentes deste factor de transcrição são os genes *TRX2*, que codifica a proteína tiorredoxina envolvida na resistência ao stress oxidativo (Kuge and Jones, 1994), *YCF1* que codifica um transportador do tipo “ATP-binding cassette” essencial para a tolerância a cádmio e arsénio (Wemmie *et al.*, 1994), *GSH1* que codifica para a enzima γ -glutamylcisteína sintase envolvida na biossíntese de glutathione (Wu and Moye-Rowley, 1994) e *GLR1* que codifica para a enzima glutathione redutase (Grant *et al.*, 1996).

O factor de transcrição Yap1 foi o primeiro membro da família Yap a ser caracterizado. Este factor de transcrição, assim como outros pertencentes a esta família, (Figura 1.2) apresentam resíduos de cisteína nas suas regiões carboxilo-terminal que estão envolvidas no controlo redox (Rodrigues-Pousada *et al.*, 2010). Em condições fisiológicas, o Yap1 entra no núcleo através da importina Pse1. No núcleo, a sequência de exportação nuclear (NES) do Yap1 (Figura 1.4) é reconhecida pela exportina Crm1, resultando na sua exportação para o citoplasma (Kuge *et al.*, 1997; Yan *et al.*, 1998). Porém, quando a célula é sujeita a condições de stress, o factor de transcrição Yap1 sofre modificações conformacionais que mascaram o NES, resultando na sua acumulação no núcleo (Delaunay *et al.*, 2000).

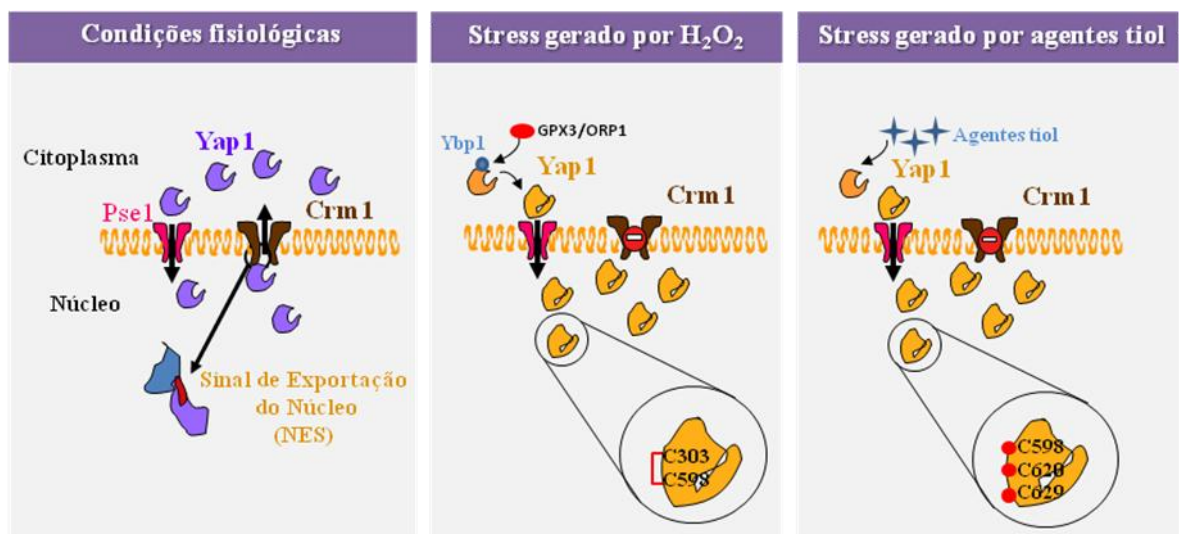


Figura1.5 Representação esquemática das formas de acumulação nuclear e consequente activação do factor de transcrição Yap1.

Capítulo 1 Introdução

A proteína Yap1 pode ser activada de duas formas distintas. No caso de a célula ser exposta a H_2O_2 forma-se uma ligação dissulfureto entre os resíduos de cisteína 303 da região amino-terminal e cisteína 598 da região carboxilo-terminal do Yap1. A oxidação destes resíduos não é directa. A proteína Orp1/Gpx3 (“receptor peroxidase 1”) e a proteína Ybp1 (“Yap1 binding protein”), que forma um pré-complexo com o Yap1, actuam como sensores do stress provocado por H_2O_2 . A transdução de sinal para o Yap1 é feita através da formação de uma ligação dissulfureto intermolecular entre a cisteína 36 de Orp1/Gpx3 e a cisteína 598 do Yap1. Posteriormente, a ligação intermolecular resulta na formação da ligação dissulfureto intamolecular entre as cisteínas 303 e 598 do Yap1 (Toledano *et al.*, 2004). Apesar de ainda não ser conhecido o papel da proteína Ybp1 na transdução de sinal, sabe-se que o pré-complexo entre as proteínas Yap1 e Ybp1 é essencial para a oxidação do Yap1. Recentemente, foi descrito que na célula existem dois conjuntos de Yap1: um conjunto em que o pré-complexo com Ybp1 está formado e é estável, sendo apenas activado pela presença de H_2O_2 na célula, e outro conjunto em que a proteína Yap1 não está associada a Ybp1 (Gulshan *et al.*, 2011).

Quando a célula é sujeita a agentes susceptíveis de reagir com grupos tiol das proteínas (onde se incluem os metais), a via de activação do Yap1 é independente de Orp1/Gpx3, ficando a droga ligada directamente aos resíduos de cisteínas 598, 620 e 629 da região C-terminal próximos da zona NES do Yap1 (Azevedo *et al.*, 2003) (Figura 1.5).

1.3. Cobalto e suas aplicações

O cobalto é um metal de transição. Os compostos que contêm cobalto ocorrem na sua maioria nos estados de oxidação 0, +2 e +3. O estado de oxidação +2 deste elemento é mais estável que o estado +3 uma vez que, Co^{+3} é um agente oxidante suficientemente forte para oxidar a água com a libertação de oxigénio. Estas propriedades são semelhantes às dos elementos do mesmo Período da tabela periódica, ferro e níquel (Lippi *et al.*, 2006). Este elemento encontra-se também associado a outros compostos tais como oxigénio, arsénio e enxofre (Gerberding, 2004). Biologicamente, o cobalto é considerado um micronutriente fazendo parte da constituição da vitamina B₁₂ (também designada cianocobalamina) (Martens *et al.*, 2002). Esta vitamina é essencial à vida animal e no entanto, a sua produção *de novo* só é possível em algumas espécies de bactérias e archaea. Para que esta molécula cumpra a sua função como coenzima tem de sofrer modificações na sua estrutura (Berg *et al.*, 2003), podendo existir na forma de 5'-deosoxiadenosilcobalamina (coenzima B₁₂) e metilcobalamina (Martens *et al.*, 2002).

Numa perspectiva económica, o cobalto possui inúmeras aplicações industriais sendo utilizado em vários materiais tais como em discos para polimento de diamante (Alves and Rosa, 2003), catalisadores químicos (Roesems *et al.*, 2000), turbinas de gás, materiais electroquímicos (Stadler and Schweyen, 2002), corantes de vidro, cerâmica e tintas, é também utilizado como suplemento vestíglial na agricultura assim como na medicina, na indústria do petróleo é utilizado como catalizador (Gerberding, 2004), aparece ainda na composição de objectos banhados com metal sendo os botões um exemplo (<http://dermnetnz.org/dermatitis/cobalt-allergy.html>) e é utilizado principalmente na produção de ligas metálicas (designadas metais duros) (Roesems *et al.*, 2000). Os metais duros são um tipo de metal mais resistente e por isso é utilizado na indústria e em engenharia militar fazendo parte da constituição dos motores de aviões a jacto, ímanes, ferramentas cortantes e de moagem; é utilizado ainda no âmbito da medicina em próteses tais como os quadris e joelhos artificiais (Gerberding, 2004).

1.4. Toxicidade provocada pelo excesso de cobalto

A exposição ao cobalto é frequente uma vez que este ocorre naturalmente na Natureza, principalmente em zonas vulcânicas, podendo acumular-se nos solos, meios aquáticos e no ar. Por outro lado, as imediações de zonas industriais e zonas com forte tráfego aéreo e rodoviário apresentam também elevadas concentrações de cobalto (Gerberding, 2004). Para além da exposição ambiental, a exposição ao cobalto também pode ser ocupacional. Assim, profissionais nas áreas da cerâmica, pintura e produção, processamento e manuseamento de metais duros são os mais expostos a este metal (Lison *et al.*, 1996; Roesems *et al.*, 2000). A principal e mais grave doença associada à exposição ocupacional de cobalto é a “hard metal lung disease” ou doença intersticial do pulmão (Kelleher *et al.*, 2000). O cobalto é ainda um sensibilizante da pele provocando dermatite de contacto (Nemery and Abraham, 2007).

A ingestão de cobalto em quantidades superiores às necessárias poderá ocorrer através de alimentos com níveis de cobalto acima do normal (2004) ou caso seja usado como “doping”. A ingestão de cobalto pode também ser receitada medicinalmente para o tratamento de anemia pré-natal, em crianças e pacientes com anemia crónica (Gerberding, 2004; Lippi *et al.*, 2005). Quando em excesso, o cobalto desencadeia uma resposta idêntica à verificada em condições de hipoxia. Quando entra no corpo é distribuído e acumulado principalmente pelo fígado, rins, ossos e coração (Lippi *et al.*, 2005; Lippi *et al.*, 2006) e será absorvido consoante a solubilidade das partículas a que está associado (Gerberding, 2004). A acumulação de cobalto nestes órgãos em grandes quantidades leva a hepatotoxicidade, nefrotoxicidade, danificação dos órgãos e à sua disfunção, sendo o stress oxidativo provocado pela presença de cobalto considerado o responsável pela perda de funcionalidade destes órgãos. De facto, uma vez no citoplasma o cobalto é reduzido e pode participar em reacções de Fenton (Kasprzak, 1991), gerando stress oxidativo:



Em plantas sabe-se que, quando existe excesso de cobalto no solo, este compete com o ferro na absorção pelas raízes. Foi verificado que excesso de cobalto provoca tanto stress oxidativo como uma desregulação da homeostase do ferro (Morrissey *et al.*, 2009).

1.4.1. O excesso de cobalto em levedura

Na levedura, a presença de cobalto desencadeia uma resposta ao nível molecular que mimetiza a que ocorre em células sujeitas à privação de ferro (Stadler and Schweyen, 2002). A entrada de ferro na célula é essencial para que esta consiga sobreviver na presença de cobalto uma vez que células que não conseguem transportar ferro para o seu interior são extremamente sensíveis à presença deste metal (Li and Kaplan, 1998). Assim, a primeira resposta da célula à presença de cobalto consiste na indução de transportadores de alta afinidade para o ferro (Stadler and Schweyen, 2002). Foi proposto por Li *et al.* que a entrada de cobalto na célula ocorre maioritariamente através de um transportador de baixa afinidade para ferro, o Fet4 (Li and Kaplan, 1998). A análise de perfis transcricionais de células de levedura expostas a concentrações elevadas de cobalto revelou que para além dos genes do metabolismo do ferro, este metal induz ainda a transcrição de vários genes envolvidos na resposta ao stress oxidativo (Stadler and Schweyen, 2002). Foi ainda proposto que a proteína transmembranar, Cot1 poderá desempenhar um papel importante na desintoxicação intracelular de cobalto uma vez que, quando o seu gene é sobre-expresso, as células apresentam uma maior resistência à presença deste ião (Conklin *et al.*, 1992). Sendo Cot1 uma proteína vacuolar, a toxicidade celular do cobalto poderá ser evitada através do seu armazenamento neste organelo (Li and Kaplan, 1998), à semelhança do que ocorre com outros metais (Rodrigues-Pousada *et al.*, 2010).

Objectivos

No nosso laboratório foi verificado que o mutante *yap1* é sensível à presença de cobalto no meio e, através da análise dos perfis transcricionais, foram identificados vários genes dependentes de Yap1 que poderão justificar a sensibilidade ao cobalto exibida pelo mutante. Com o intuito de compreender os mecanismos moleculares orquestrados pelo factor de transcrição Yap1 na resposta ao stress provocado por cobalto, constituem objectivos da presente dissertação de Mestrado:

- (i) Esclarecer o mecanismo de activação do Yap1 pelo cobalto.
- (ii) Validar alguns dos genes que exibem expressão alterada nos perfis transcricionais de células da estirpe mutante *yap1* sujeitas ao tratamento com cobalto.
- (iii) Avaliar a contribuição do stress oxidativo na toxicidade do cobalto.
- (iv) Investigar outras vias que em conjunto com o stress oxidativo possam contribuir para a sensibilidade do mutante *yap1* ao cobalto.

Capítulo 2

Material e Métodos

2.1. Estirpes e condições de crescimento

As estirpes utilizadas neste trabalho encontram-se listadas na Tabela 2.1.

As células foram crescidas a 30°C em meio sintético completo (SC) [*yeast nitrogen base* (YNB) 6,7 g/L, casCAA 0,6%, glucose 2%, triptofano 0,02%, adenina 0,01%, uracilo 0,02%] ou em meio sintético selectivo (SD) [(arginina 0,02%, isoleucina 0,03%, lisina 0,03%, metionina 0,02%, fenilalanina 0,05%, treonina 0,2%, tirosina 0,03%, valina 0,15%, glucose 2%, YNB 6,7g/L] suplementado com os aminoácidos apropriados de acordo com a auxotrofia das diferentes estirpes.

Para efectuar as curvas de crescimento, as culturas foram diluídas, em meio SC fresco com as diferentes concentrações de sulfato de cobalto até uma $DO_{600}=0,1$. A densidade óptica das culturas foi avaliada a 600 nm nos tempos indicados.

Os ensaios fenotípicos foram realizados através do plaqueamento de 5µl de diluições sequenciais das culturas no início da fase exponencial (aproximadamente de 5×10^3 a 5×10^8 células) em placas contendo meio SC, sem droga, suplementado com as concentrações de sulfato de cobalto indicadas e/ou com as concentrações de GSH declaradas. O crescimento ocorreu durante dois ou 3 dias a 30°C.

Tabela 2.1 Estirpes de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas no estudo.

Estirpe	Genótipo	Fonte
BY4742	MATa <i>his3Δ1 leuΔ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>	Euroscarf
FY1679-01B	MATa <i>ura3-52; LEU2; TRP1; HIS3; GAL2</i>	Euroscarf
BY4742 yap1Δ	MATa <i>his3Δ1 leuΔ0 met15Δ0 ura3Δ0 yap1Δ::kanMX4</i>	Euroscarf
YPH98 orp1Δ	MATa, <i>ura3-52, lys2-801^{amber}, ade2-101^{ochre} trp1Δ1 leu2Δ1 orp1Δ</i>	(Delaunay <i>et al.</i> , 2002)

2.2. Manipulação de DNA e plasmídeos

Todos os plasmídeos utilizados na presente dissertação estão identificados na tabela 2.2.

Tabela 2.2 Plasmídeos utilizados no presente trabalho.

Designação	Descrição	Fonte
GFP-Yap1	<i>YAP1</i> fundido com <i>GFP</i> no seu N-terminal	(Kuge <i>et al.</i> , 1997; Delaunay <i>et al.</i> , 2000)
GFP-cCRDYap1	Região C-terminal do Yap1, rica em cisteínas, fusionada com a proteína GFP no seu N-terminal	(Azevedo <i>et al.</i> , 2003)
Myc-Yap1	<i>Yap1</i> fundido com o fragmento Myc tag no seu N-terminal	(Kuge <i>et al.</i> , 1997; Delaunay <i>et al.</i> , 2000)

2.3. Preparação de células competentes de levedura

O procedimento de transformação de leveduras usado foi o protocolo descrito por Gietz *et al* (Gietz and Schiestl, 1991), com modificações. Células em fase estacionária foram utilizadas para inocular 20mL de meio YPD (1% extrato de levedura, 2% de bactopectona, 2% glucose) a uma DO_{600} de partida de 0,1 e cresceram a 30°C com agitação até atingirem uma DO_{600} 0,7. As células foram centrifugadas durante 2 minutos a 7200xg, ressuspendidas em água destilada estéril e transferidas para um tubo Eppendorf 1,5mL. Depois de centrifugadas mais uma vez as células foram ressuspendidas em TE 1X/LiAc 100mM estéril preparado de fresco e guardadas a 4°C.

2.4. Transformação de células competentes de levedura

Às células competentes foram adicionados 0,1µg/µl do plasmídeo a transformar, 0,1mg/ml de DNA de esperma de salmão (Sigma) e 6x o volume de uma solução 40% m/v PEG3340 em LiAc (LiAc 100mM, TE 1X). Após incubação durante 40 minutos a 30°C com agitação, deu-se o choque térmico a 42°C, 15 minutos, e lavou-se com água estéril. As células foram posteriormente plaqueadas em meio selectivo crescidas durante 48 horas a 30°C.

2.5. Preparação das amostras de RNA e análise por Real-time PCR

Nos ensaios de Real-Time PCR, as células no início da fase exponencial ($DO_{600} = 0,4-0,5$) foram induzidas com $CoSO_4$ e posteriormente recolhidas nos tempos indicados.

O conteúdo total de RNA das células foi extraído utilizando o RNeasy® Mini Kit (QIAGEN) e as amostras foram tratadas com TURBO™ DNase segundo as indicações dos fabricantes.

Tabela 2.3 Oligonucleótidos necessários para a reacção de RT-PCR.

Gene	Sequência
<i>ACT</i>	5'cta ttg gta acg aaa gat tca g 3'
	5' cct tac gga cat cga cat ca 3'
<i>GPX2</i>	5'cgg aag taa tgc tga ctc tgt c 3'
	5' ggt cca agg acg atg gtt tt 3'
<i>GSH1</i>	5' agg cgt ggt gaa aaa gtt tg 3'
	5' tgc cct ctt tgt ctt ctg gt 3'
<i>TRX2</i>	5' ggt cac tca att aaa atc cgc ttc 3'
	5' cga cga ctc tgg taa cct cct tac 3'
<i>TRR1</i>	5' cca cac tcc agc aac aaa ga 3'
	5'atc acc agc agc gaaa aaa tc 3'
<i>SOD1</i>	5' agc caa cca ctg tct ctt acg a 3'
	5' aca cca ttt tgc tcc gtc ttt a 3'

Na síntese de cDNAs foi utilizada a enzima “Transcriptor Reverse Transcriptase” (Roche) Utilizou-se o kit LightCycler LC-Faststart DNA Master SYBER Green I na preparação das reacções de qRT-PCR (oligonucleótidos necessários estão identificados na Tabela 2.3). As reacções foram processadas no equipamento LightCycler (Roche) e analisadas através do LightCycler® Software 4.1. A expressão dos genes foi normalizada em relação à expressão do gene codificando os mensageiros da actina e foi usado o método de quantificação relativa com curvas padrão e correcção de eficiências.

2.6. Análise de células expressando as proteínas de fusão GFP-Yap1 e GFP-cCRDYap1

As estirpes contendo os plasmídeos GFP-Yap1 ou GFP-cCRDYap1 foram crescidas em meio mínimo selectivo (SD) até atingir a DO_{600} 0,4 e submetidas ao stress com 2mM de $CoSO_4$. Em diferentes tempos, foram retirados 2mL de cultura e adicionado 1mg/mL de DAPI, foram posteriormente incubadas durante 6 minutos a 30°C com agitação. As células foram centrifugadas a 7200xg durante 2 minutos, o sobrenadante foi descartado e foram lavadas com PBS 1X com posterior centrifugação. Para análise, as células foram ressuspensas em 10µl de DABCO (glicerol 75%, PBS 0,25X e 1,4 diazabíclio [2.2.2] octano). A análise foi feita utilizando o microscópio óptico de fluorescência LEICA DMRA2 equipado com uma câmara Photometrics Cool SNAPTM HQ e MetaMorph software (Universal Imaging Inc).

2.7. Preparação dos extractos proteicos e análise por Western Blot

A estirpe selvagem transformada com o plasmídeo Myc-Yap1 crescida em meio SD até atingir DO_{600} 0,4 e submetida ao stress com 2mM de $CoSO_4$. Para a extracção de total proteínas foram recolhidos 50 ml de cultura celular antes e após a incubação com droga. As células foram centrifugadas durante 4 minutos a 1200xg, lavadas e ressuspensas em tampão de extracção de proteínas (TCA 10% em água bidestilada). A parede celular foi lisada pela adição de pérolas de vidro e agitação durante 10 minutos. Depois de centrifugar durante 20 minutos a 15000xg, o sobrenadante foi recolhido. O extracto foi centrifugado a 1200xg durante 5 minutos e lavado três vezes com acetona 100%, sendo sempre o sobrenadante descartado. Após a última lavagem, o pellet foi seco utilizando o equipamento Speed vac Plus SC110A a baixa temperatura. Todo o procedimento foi executado à temperatura de 4°C. O pellet foi solubilizado em tampão composto por SDS 1%, tampão Tris pH 8,5 100mM, inibidores de protease (conforme as indicações do fabricante) e PMSF 1mM e incubado a 80°C durante 5min. O conteúdo proteico foi quantificado pelo método de Bradford (Bradford-BIORAD). O AMS foi adicionado ao extracto proteico numa concentração final de 15mM e foi incubado 20 minutos à temperatura ambiente e 5 minutos a 37°C.

Capítulo 2 Materiais e Métodos

O gel de resolução de poliacrilamida 12% (m/v) foi preparado misturando diferentes componentes nas seguintes proporções: 12mL de acrilamida/bis-acrilamida (30%/0,8% m/v), 7,5mL de Tris-HCl 1,5M pH 8,8, 150µl de SDS 20% (m/v), 10,2mL de água bidestilada e estéril, 150µl de PSA 10% (m/v) e 20µl de TEMED. Após a polimerização do gel de resolução foi preparado o gel de concentração 4% (m/v) misturando os seguintes componentes: 670µl de acrilamida/bis-acrilamida (30%/0,8% m/v), 1,25mL de Tris-HCl 0,5M pH 6,8, 25µl de SDS 20% (m/v), 3,075 mL de H₂O destilada e estéril, 25µl de PSA 10% (m/v) e 5µl de TEMED. Após a polimerização do gel, os poços foram lavados com tampão de corrida SDS-PAGE 1X (stock 10X: Tris 250mM, glicina 2M e 1% (m/v) de SDS). A electroforese foi realizada no sistema BioRad Mini-Protean II e decorreu a 100V em tampão de corrida SDS-PAGE 1X até as amostras atingirem o final do gel. Após a electroforese, o gel contendo as amostras de proteína foi imediatamente embebido em tampão de transferência durante 10 minutos. Três folhas de papel 3MM (Whatman) do tamanho do gel foram previamente embebidas no mesmo tampão de transferência e colocadas no ânodo do aparelho de transferência “ATTA Trans-Blot SD Transfer Cell”. A membrana de nitrocelulose previamente imersa em tampão de transferência foi colocada em cima das folhas de papel 3MM e o gel foi colocado sob mais 3 folhas de papel 3MM. O cátodo foi colocado sobre a montagem de transferência e a corrente eléctrica foi ajustada para 20V durante 1 hora. A eficiência da transferência das proteínas foi assegurada incubando-se a membrana com solução Ponceau S (30% (m/v) TCA e 30% (m/v) ácido sulfosalicílico diluída 1:10 com água bidestilada estéril).

A membrana de nitrocelulose foi imersa numa solução T1 (PBS 1X, 0,1% Tween 20) com 5% (m/v) de leite em pó e incubada a 4°C durante a noite, com agitação lenta de forma a bloquear-se a adsorção não-específica de reagentes imunológicos. A membrana foi lavada com a mesma solução e incubada com o anticorpo primário anti-cMyc (Roche) e para o “loading control” o anti-Pgk1 (Sigma) durante a noite a 4°C com agitação lenta. Posteriormente, a membrana foi lavada três vezes durante 10 minutos com solução T1 e incubada com o anticorpo secundário nos casos em que foi utilizado o anticorpo primário (anti-mouse (Santa Cruz Biotechnology), para ambos os anticorpos primários utilizados). A detecção foi realizada usando o kit de detecção SuperSignal[®] West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Scientific). A membrana foi então exposta a um filme autoradiográfico (Hyperfilm MP, Amersham).

2.8. Preparação das amostras e análise por OxyBlot

As culturas de células da estirpe selvagem e do mutante *yap1* no início da fase exponencial ($DO_{600}= 0,4-0,5$) foram induzidas com 2mM de $CoSO_4$ e recolhidas após 60 e 90 minutos. As células foram ressuspensas em tampão de lise [50mM tampão Tris pH 7,5, 100mM NaCl, 5mM $MgCl_2$ 5% β -mercaptoetanol, Inibidores de protease (utilizado segundo as indicações do fabricante)]. A parede celular foi lisada pela adição de pérolas de vidro e agitação durante 10 minutos. Depois de centrifugar durante 20 minutos a 15000xg, o sobrenadante foi recolhido e armazenado a $-80^{\circ}C$. A reacção de derivatização foi realizada com o kit OxyBlotTM Protein Oxidation Detection Kit, segundo as indicações do fabricante. A detecção imunológica foi efectuada com os anticorpos primário e secundário fornecidos pelo kit e o “loading control” utilizando o anticorpo primário anti-Pgk1 (Sigma) e o secundário anti-mouse (Santa Cruz Biotechnology).

2.9. Preparação das amostras para análise por emissão atómica

Culturas das estirpes selvagem e mutante *yap1* foram diluídas, em meio SC fresco com 2mM de $CoSO_4$ até uma $DO_{600}=0,1$ para um volume final de 10mL. Foram incubadas a $30^{\circ}C$ com agitação durante 20 horas. As culturas foram centrifugadas durante 5min a 1200xg e o sobrenadante foi descartado. O pellet foi lavado uma vez com 5mL de EDTA 10mM pH8 e centrifugado, o sobrenadante foi descartado. O pellet foi lavado duas vezes com 5mL água miliQ (Q-POD[®] MiliQwater- Milipore) e centrifugado, sendo o sobrenadante descartado. As células foram ressuspensas em 5mL de água miliQ (Q-POD[®] MiliQwater- Milipore) e o valor DO_{600} foi medido. 4mL da suspensão de células foi transferido para tubos HS23204N (Heathrow Scientific[®] LLC) e centrifugada a 1200xg durante 5min. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspensado em 1mL de Ácido nítrico 10% (v/v). As amostras foram aquecidas a $98^{\circ}C$ durante 18 horas. As amostras foram filtradas com Sterile Syringe Filter w/0,2 μm Cellulose Acetate Membrane (VWR) e o filtrado transferido para novos tubos HS23204N (Heathrow Scientific[®] LLC). As amostras foram processadas no serviço de espectrometria de massa do REQUIMTE. Os resultados provenientes desta análise foram normalizados contra os valores de DO_{600} medidos para cada amostra.

2.10. Preparação das amostras para análise por HPLC

A estirpe selvagem e mutante *yap1* cresceram em meio SC até atingir DO_{600} 0,4 e submetida ao stress com 2mM de $CoSO_4$. Foram recolhidos 30 ml de cultura celular antes e após a incubação com droga. As células foram centrifugadas durante 3 minutos a 1200xg a 4°C e lavadas com 1mL de água bidestilada sendo centrifugadas novamente durante 3 minutos a 1200xg, o sobrenadante foi descartado. O pellet foi ressuspensionado em 150 µL de tampão ácido (ácido metafosfórico 10% (V/V) em água bidestilada). A parede celular foi lisada pela adição de pérolas de vidro e agitação durante 10 minutos a 4°C seguindo-se uma centrifugação de 5 minutos a 10000xg, o sobrenadante foi recolhido. O extracto foi centrifugado a 10000xg durante 30 minutos. O sobrenadante foi transferido para tubos de polipropileno (50 µL para a determinação dos níveis de GSH e 200 µL para a determinação dos níveis de GSSG). A derivatização foi efectuada de acordo com Kand'ar *et al.* (Kand'ar *et al.*, 2007). Para a análise dos níveis de GSH foi adicionado 1mL de 0,1% (m/V) EDTA em 0,1M hidrogenofosfato de sódio, pH 8,0, aos 50 µL de sobrenadante. Para 20 µL da mistura adicionou-se 300 µL de 0,1% (m/V) EDTA em 0,1M de hidrogenofosfato e 20 µL de 0,1% (m/V) ortoftaldeído (OPA) em metanol. Os tubos foram incubados a 25°C durante 15 minutos na ausência de luz. A mistura de reacção foi posteriormente mantida a 4°C antes da análise. Para a análise dos níveis de GSSG, incubaram-se 200 µL do sobrenadante com 40mM de N-etilmaleimida durante 25 minutos na ausência de luz. Adicionou-se à mistura 750 µL de 0,1M de NaOH. Retirou-se 20 µL e adicionou-se 300 µL de 0,1M NaOH e 20 µL de 0,1% (m/V) de OPA. Os tubos foram incubados a 25°C durante 15 minutos na ausência de luz e mantidos a 4°C antes da análise. Para a análise cromatográfica foi utilizada uma eluição isocrática numa coluna analítica C18 (SupelcosilTMABZ+Plus HPLC Coluna 15 cm x 4,6 mm, 3 µm (Supelco)) a 40°C no AcquityTM Ultra Performance LC system (Waters). A fase móvel é constituída por 15% (V/V) metanol e 25mM de hidrogenofosfato de sódio, pH 6,0. O fluxo foi mantido constante a 0,7mL/min. Os comprimentos de onda de excitação e emissão foram 350 e 420 nm, respectivamente. Os níveis de GSH e GSSG foram quantificados através da área dos picos correspondentes sendo utilizado o Software Empower[®] Pro 2.0. As concentrações de GSH e GSSG das amostras foram determinadas através de curvas padrão nos intervalos 0-200 µM para GSH e de 0-10 µM para GSSG. Os valores foram normalizados para o volume celular de acordo com os valores utilizados por Kumar *et al.* (Kumar *et al.*, 2011).

Capítulo 3

Resultados e Discussão

3.1. O Yap1 é necessário na resposta ao stress provocado por cobalto

Em *Saccharomyces cerevisiae*, o factor de transcrição Yap1 possui um papel determinante na resposta ao stress oxidativo e ao stress provocado por metais (Rodrigues-Pousada *et al.*, 2010). Sendo o cobalto (II) um metal com capacidade de gerar stress oxidativo nas células (Kasprzak, 1991), fomos, numa primeira fase do trabalho, verificar se o factor de transcrição Yap1 seria crucial para a sobrevivência da levedura em ambientes com excesso de cobalto (Figuras 3.1).

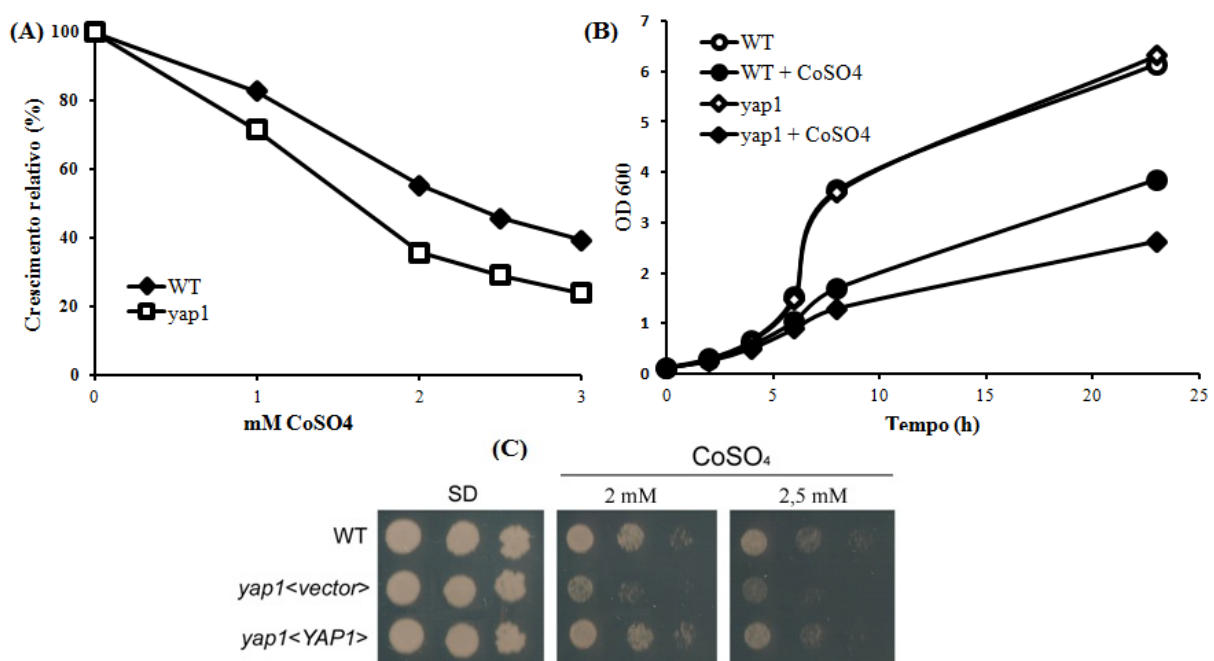


Figura 3.1 Tolerância do mutante *yap1* ao stress provocado por sulfato de cobalto (CoSO₄). (A) Crescimento da estirpe selvagem (WT) e mutante *yap1* (*yap1*) durante 20h, nas concentrações de CoSO₄ indicadas. (B) Curva de crescimento das estirpes selvagem (WT) e mutante *yap1* (*yap1*) na ausência ou presença de 2mM de CoSO₄. (C) Crescimento das estirpes selvagem (WT), mutante *yap1* (*yap1*<vector>) e mutante *yap1* transformado com o plasmídeo contendo o gene *YAP1* (*yap1*<YAP1>), durante 48 horas em meio sintético completo sólido suplementado com 2mM e 2,5 mM de CoSO₄.

A sensibilidade do mutante *yap1* ao cobalto é notória a partir de concentrações de 1mM de CoSO₄ (Figura 3.1 A e B). Para ensaios posteriores foi seleccionada a concentração de 2mM de CoSO₄, para a qual a viabilidade celular das estirpes selvagem e *yap1* está comprometida em 40% e 60%, respectivamente (Figura 3.1 A). Esta concentração foi também utilizada por outros autores (Stadler and Schweyen, 2002).

Capítulo 3 Resultados e Discussão

O mutante *yap1* transformado com um plasmídeo contendo o gene *YAP1*, não exibe sensibilidade à presença de cobalto (2 e 2,5 mM CoSO₄) e apresenta um crescimento idêntico ao da estirpe selvagem (Figura 3.1 C).

Estes resultados indicam que o factor de transcrição Yap1 é necessário para sobrevivência celular na presença de excesso de cobalto.

3.2. O Yap1 influencia os níveis intracelulares de cobalto e ferro

De modo a investigarmos se a sensibilidade do mutante *yap1* poderia estar relacionada com um aumento dos níveis de cobalto, determinamos por emissão atômica os níveis deste metal na estirpe mutante, após o tratamento durante 20 horas com 2mM de CoSO_4 , e comparamo-los com os níveis na estirpe selvagem. Surpreendentemente, verificámos que o mutante *yap1* possui níveis de cobalto inferiores aos da estirpe selvagem (Figura 3.2). Foi sugerido por Rosenfeld *et al*, que o cobalto entrará na célula através do transportador de fosfatos, Pho84 (Rosenfeld *et al.*, 2010). A análise de perfis transcricionais do mutante *yap1* na presença de cobalto indica que o gene que codifica o transportador Pho84 é regulado positivamente pelo factor de transcrição Yap1 (Pimentel *et al*, resultados não publicados). Assim, a diminuição dos níveis intracelulares de cobalto na estirpe *yap1* poderá ser justificada pela diminuição da expressão do gene *PHO84*. Concomitantemente, também foram analisados por emissão atômica os níveis de ferro intracelular nas duas estirpes, após o tratamento com CoSO_4 . De acordo com outros autores (Li and Kaplan, 1998; Stadler and Schweyen, 2002), constatámos que a concentração de ferro intracelular aumenta após o stress gerado por cobalto, sendo esse aumento mais acentuado no mutante *yap1* (Figura 3.2).

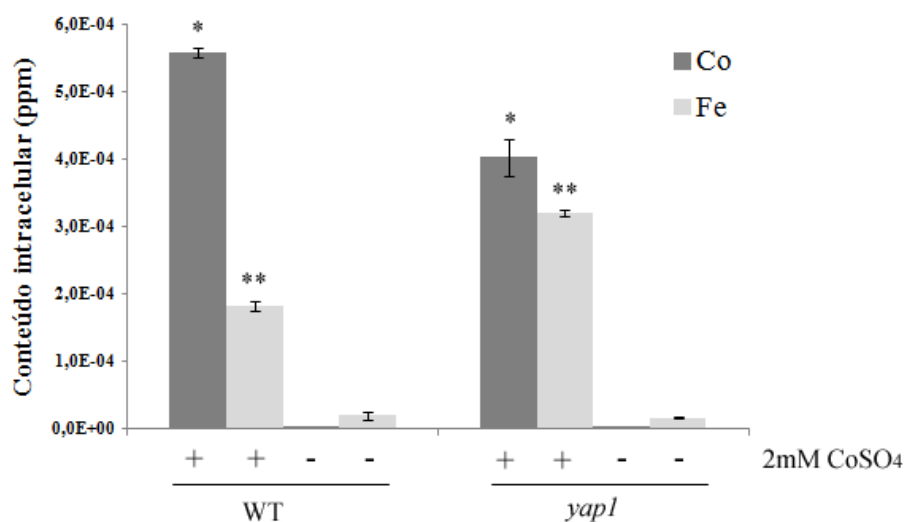


Figura 3.2 Conteúdo intracelular de cobalto e ferro das culturas selvagem (WT) e mutante *yap1* (*yap1*) antes (-) ou após (+) a adição de 2mM de CoSO_4 às culturas celulares, $p < 0,05$.

3.3. O excesso de cobalto direcciona o Yap1 para o núcleo

Foi demonstrado que o factor de transcrição Yap1, em condições normais de crescimento, é exportado do núcleo para o citoplasma sofrendo, em condições de stress, modificações conformacionais que culminam na sua acumulação no núcleo. Essas modificações resultam da formação de ligações de dissulfureto ou da ligação directa da droga a grupos tiol de resíduos de cisteína, ocorrendo, em ambos os casos, o bloqueio do local de exportação nuclear (NES) do Yap1, que não poderá ser reconhecido pela exportina nuclear Crm1 (Kuge *et al.*, 1997; Yan *et al.*, 1998).

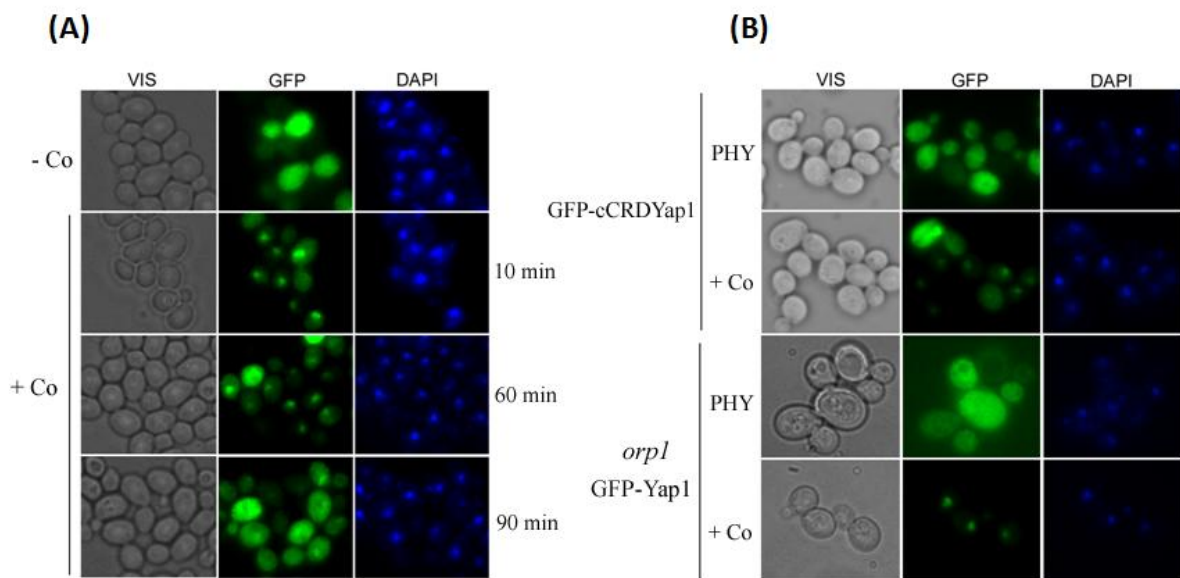


Figura 3.3 Distribuição celular do factor de transcrição Yap1 (A) Localização da construção GFP-Yap1 em condições normais de crescimento (-Co) ou após o tratamento durante 10, 60, 90 minutos com 2mM de CoSO₄. (B) Localização celular da construção GFP-cCRDYap1 na estirpe selvagem e da construção GFP-Yap1 no mutante *orp1*, em condições fisiológicas e após 60 minutos de tratamento com 2mM de CoSO₄.

Neste trabalho verificámos que, 10 minutos após a incubação com 2mM de CoSO₄, a proteína Yap1 fundida com a proteína de baixo massa molecular GFP (GFP-Yap1) localiza-se no núcleo (Figura 3.3 A). De modo a averiguarmos se o ião cobalto (II) tem a capacidade de se ligar directamente ao Yap1, a mesma construção foi utilizada para transformar o mutante *orp1*. Este mutante não tem a capacidade de activar o Yap1 através da formação de ligação dissulfureto entre os resíduos Cys303 N-terminal e Cys598 C-terminal (Azevedo *et al.*, 2003). Observámos que em células *orp1* a localização da construção Yap1-GFP continua a ser nuclear (Figura 3.3 B), pelo que a formação das

referidas ligações de dissulfureto não podem justificar a activação deste factor pelo cobalto. A corroborar estes resultados verificámos que uma construção comportando apenas o domínio C-terminal do Yap1 fundido com GFP (GFP-cCRDYap1) exhibe retenção nuclear (Figura 3.3 B), após o tratamento com 2mM de CoSO_4 . A acumulação de Yap1 no núcleo dever-se-á à ligação de cobalto (II) aos resíduos Cys598, Cys620 e/ou Cys629 do domínio C-terminal.

A existência de uma interacção directa entre o cobalto e o factor de transcrição Yap1 foi posteriormente comprovada através de um ensaio utilizando AMS (4-acetamido-4'-maleimidylstilbene-2,2'-disulfonic acid, disodium salt). Esta molécula reage especificamente com grupos tiol presentes em péptidos ou polipéptidos, aumentando a sua massa molecular em 0,5 KDa.

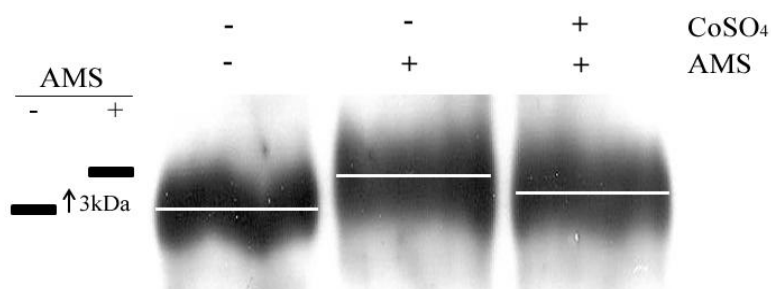


Figura 3.4 O cobalto liga-se directamente aos resíduos de cisteína do Yap1. A estirpe selvagem foi transformada com Yap1-cMyc. Células em fase exponencial de crescimento foram tratadas com 2mM de CoSO_4 durante 30 minutos. Os extractos proteicos foram posteriormente incubados com AMS, analisados por Western blot com anticorpo anti-cMyc e comparados com extractos proteicos de condições controlo (sem stress e com AMS; sem stress e sem AMS). Os traços brancos indicam o eixo de simetria horizontal das bandas.

Quando extractos proteicos, na ausência de CoSO_4 , são tratados com AMS, é possível verificar o aumento de massa molecular equivalente à reacção entre as moléculas de AMS e os resíduos de cisteína disponíveis no Yap1 (Figura 3.4). Quando as células são incubadas com CoSO_4 e os extractos proteicos tratados com AMS, o aumento de massa molecular de Yap1 não é tão elevado, sugerindo que alguns resíduos de cisteína estarão ocupados por este metal.

No seu conjunto, os resultados apresentados nesta secção mostram que o ião cobalto (II) tem a capacidade de se ligar directamente às cisteínas do domínio C-terminal do factor de transcrição Yap1 (Figura 3.4), conduzindo à sua acumulação no núcleo.

3.4. Cobalto gera stress oxidativo acentuado na ausência de Yap1

A análise de perfis transcricionais de células tratadas com cobalto revelou a indução de vários genes envolvidos na resposta ao stress oxidativo (Stadler and Schweyen, 2002). Assim, seria expectável que uma das linhas de resposta orquestrada pelo Yap1 ao stress gerado por cobalto consistisse na regulação da expressão de alguns destes genes. De facto, recentemente, no nosso laboratório, a comparação do perfil transcricional do mutante *yap1* com o da estirpe selvagem após o tratamento com 2mM sulfato de cobalto (Pimentel *et al*, resultados não publicados), revelou a diminuição da expressão de muitos genes cruciais na resposta ao stress oxidativo (Tabela 3.1).

Tabela 3.1 Genes envolvidos na resposta ao stress oxidativo que exibem expressão alterada no mutante *yap1* comparativamente à estirpe selvagem, após tratamento de ambas as estirpes durante 60 minutos com 2mM de CoSO₄ (Pimentel *et al*, resultados não publicados)

Resposta ao stress oxidativo			
ORF	Gene	FC*	Descrição
YBR244w	<i>GPX2</i>	-11.9	Peroxidase glutationa hidroperoxidase fosfolipídica
YML028w	<i>TSA1</i>	-2.9	Tiorredoxina peroxidase
YOL151w	<i>GRE2</i>	-2.9	3-metilbutanal reductase
YGR209c	<i>TRX2</i>	-2.4	Tiorredoxina Citoplasmática
YJR104c	<i>SOD1</i>	-2.4	Cobre-Zinco Superóxido dismutase Citosólica
YJL101c	<i>GSH1</i>	-2.0	γ-glutamylcisteína sintetase
YKL086w	<i>SRX1</i>	-1.8	Sulfiredoxina
YLR109w	<i>AHP1</i>	-1.7	Peroxiredoxina Tiol-específica
YDR353w	<i>TRR1</i>	-1.5	Tiorredoxina reductase citoplasmática
YBL064c	<i>PRX1</i>	-1.5	Peroxirredoxina mitocondrial

*FC-fold change

Capítulo 3 Resultados e Discussão

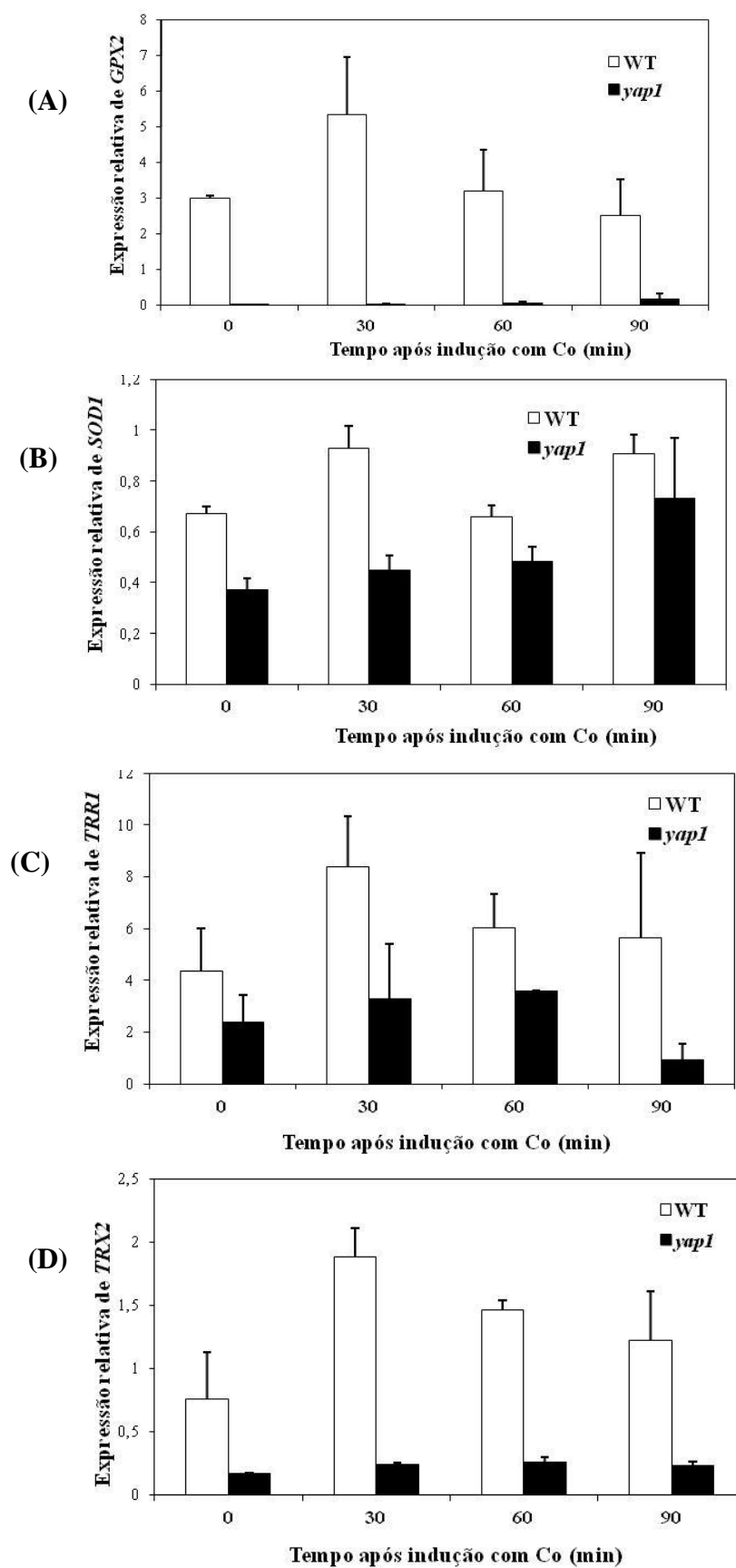


Figura 3.5 A dependência de vários genes do stress oxidativo do factor de transcrição Yap1, aumenta após o stress gerado por excesso de cobalto. Culturas de células da estirpe selvagem e mutante foram tratadas com CoSO_4 durante os tempos indicados. Os RNAs foram extraídos e analisados por qRT-PCR com primers específicos para os genes (A) *GPX2*, (B) *SOD1*, (C) *TRR1* (D) *TRX2*.

Capítulo 3 Resultados e Discussão

Dos genes apresentados na Tabela 3.1 (Pimentel *et al.*, resultados não publicados) validámos por qRT-PCR (Real-Time PCR) a expressão dos genes, *GPX2*, *SOD1*, *TRX2* e *TRR1*. *GPX2* e *SOD1* codificam proteínas envolvidas na desintoxicação enzimática de ROS, gerados tanto pela actividade mitocondrial como pela presença de metais no citoplasma. *TRR1* e *TRX2* codificam enzimas envolvidas na reparação dos danos proteicos resultantes do stress oxidativo (Herrero *et al.*, 2008).

Verificámos que *GPX2* é um gene cuja expressão é exclusivamente dependente da presença de Yap1, sendo praticamente abolida no mutante *yap1*. Na estirpe selvagem, a transcrição deste gene aumenta aproximadamente 50% 30 minutos após a indução com CoSO_4 e, aos 60 e 90 minutos há uma diminuição dos seus níveis transcripcionais (Figura 3.5 A). *SOD1* é dependente do factor de transcrição Yap1 mas não de uma forma tão acentuada como *GPX2*. Verificámos que a expressão deste gene, na estirpe selvagem aumenta após a indução das células com CoSO_4 (Figura 3.5 B). Também a expressão do gene *TRR1* aumenta na presença de cobalto, sendo dependente da presença do factor de transcrição Yap1. (Figura 3.5 C). *TRX2* é dependente de Yap1 e a sua expressão na estirpe selvagem, aos 30 minutos aumenta 50%, sendo sempre mais elevada que os níveis de expressão observados na célula na ausência de cobalto (Figura 3.5 D).

Estes resultados confirmam a indução de genes do stress oxidativo pelo excesso de cobalto (Figura 3.5) bem como, o envolvimento do Yap1 na regulação desses genes.

De forma a confirmar se no mutante *yap1* o stress oxidativo gerado pela exposição ao cobalto seria mais intenso, examinámos o nível de carbonilação das proteínas neste mutante e comparamo-lo com o da estirpe selvagem. A sua carbonilação acontece quando as células são expostas ao stress oxidativo, pois resulta da oxidação dos resíduos treonina, prolina, arginina e lisina devido à presença de metais na célula. Em levedura, as enzimas que sofrem esta modificação vão para o proteossoma, sendo aí degradadas. A detecção destes grupos pode ser feita através da derivatização com 2,4-dinitrofenol hidrazina. A proteína resultante, 2,4-dinitrofenol hidrazona pode ser detectada por anticorpos específicos (Nystrom, 2005).

Capítulo 3 Resultados e Discussão

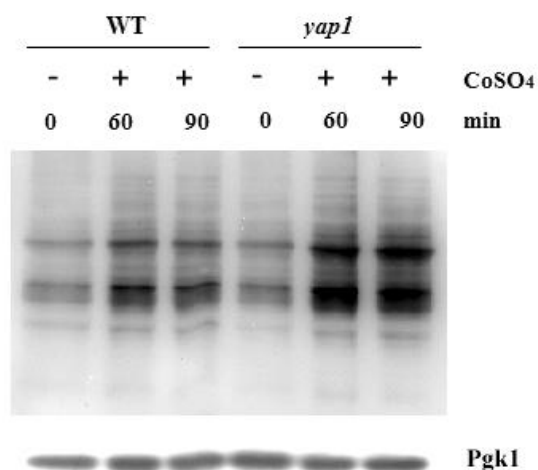


Figura 3.6 Detecção imunológica da carbonilação de proteínas nas estirpes de *S. cerevisiae* selvagem e mutante *yap1* após tratamento com CoSO₄. A proteína Pgk1 foi utilizada como controlo de quantidade.

Foi verificado que, no mutante *yap1* sujeito a tratamento com 2mM de CoSO₄ durante 60 e 90 minutos é observado um nível de carbonilação mais acentuado do que na estirpe selvagem (Figura 3.6).

Este conjunto de resultados demonstra que a acção do ião cobalto (II) provoca sérios danos oxidativos em levedura. Genes de resposta ao stress oxidativo são induzidos (Figura 3.5) e o conteúdo proteico da célula é danificado pela acção oxidante deste ião (Figura 3.6). Estes efeitos são mais pronunciados no mutante *yap1*, indicando um papel relevante deste factor de transcrição no combate ao stress oxidativo provocado pelo excesso cobalto.

3.5. A regulação da expressão do gene *GSH1* pelo Yap1 é importante para a tolerância da célula ao cobalto

O tripéptido GSH (glutathiona) está envolvido no controlo do stress oxidativo. Esta molécula é considerada o agente anti-oxidante mais abundante na célula. Em levedura, o GSH participa no sistema de reparação de danos gerados por stress oxidativo nas proteínas. O GSH desempenha um papel activo como dador de hidrogénio na via da glutarredoxina (Herrero *et al.*, 2008). Nesta via, as enzimas actuam como tiol-oxidoredutases e são responsáveis pela redução de pontes dissulfureto em proteínas ou pontes dissulfureto entre proteínas e glutathiona. Quando o GSH é reduzido, aumenta o conteúdo de GSSG, a glutathiona oxidada (Herrero *et al.*, 2008). Uma vez que o GSH tem um papel importante como anti-oxidante na célula, é necessário que os seus níveis sejam mantidos. Para além deste tripéptido ser sintetizado *de novo* pode, através da acção da enzima glutathiona redutase, ser “reciclado” através da redução do GSSG com electrões provenientes do NADPH (Barycki, 2007).

O gene *GSH1* codifica a enzima γ -glutamylcisteína sintetase que está envolvida no primeiro passo da biossíntese de GSH (Barycki, 2007). A expressão do gene *GSH1* encontra-se diminuída no mutante *yap1* na presença de cobalto (Figura 3.7). A validação desta dependência foi efectuada neste trabalho, tendo-se avaliado por qRT-PCR a expressão deste gene no mutante *yap1* e estirpe selvagem, após o tratamento com 2mM CoSO₄ durante os tempos indicados na Figura 3.7. A nossa análise indicou uma dependência da expressão do gene *GSH1* do factor de transcrição Yap1 até 30 minutos após indução com CoSO₄. No entanto, sabe-se que o gene *GSH1* é também regulado pelo factor de transcrição Met4 o que poderá justificar a dependência não total de Yap1 aos 90 minutos (Wheeler *et al.*, 2003) (Figura 3.7).

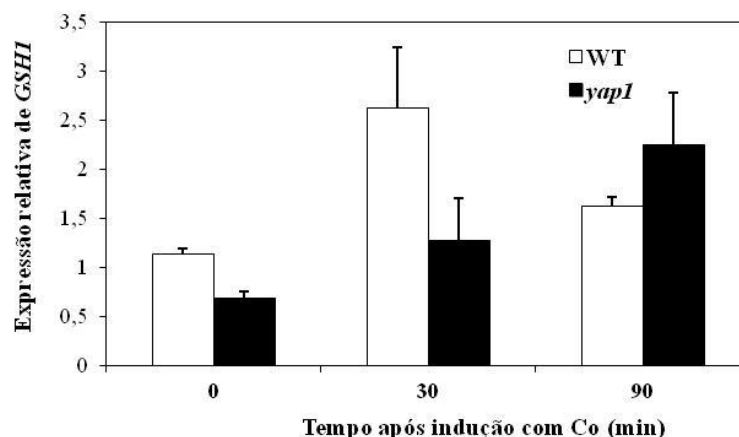


Figura 3.7 A dependência do gene *GSH1* do factor de transcrição Yap1. Culturas de células da estirpe selvagem e mutante *yap1* foram tratadas com CoSO_4 durante os tempos indicados. Os RNAs foram extraídos e analisados por qRT-PCR com primers específicos para o gene *GSH1*.

Posteriormente, avaliámos os níveis de GSH e GSSG (forma oxidada da glutathiona) nas estirpes selvagem e mutante *yap1* uma vez que, a razão entre estas duas espécies é vulgarmente utilizada como referência do estado redox da célula.

Assim, foram verificados por HPLC com coluna de fase reversa (experiência realizada em colaboração com o Laboratório Disease and Stress Biology; ITQB-UNL) os níveis intracelulares de GSH e GSSG nas estirpes selvagem e mutante *yap1* sujeitas ou não ao tratamento com CoSO_4 e calculada a razão entre GSH/GSSG (Tabela 3.2).

Tabela 3.2 Conteúdo intracelular de GSH e GSSG após 60 minutos de exposição a 2mM de CoSO_4 .

Estirpe	GSH (mM/cell)	GSSG (mM/cell)	GSH/GSSG
WT	12,23 \pm 0,03	3,35 \pm 0,14	3,65 \pm 0,15
WT+Co	8,11 \pm 1,50	0,61 \pm 0,09	13,70 \pm 4,50
<i>yap1</i>	7,3 \pm 1,10	1,87 \pm 0,30	3,91 \pm 0,04
<i>yap1</i> +Co	6,0 \pm 0,07	0,22 \pm 0,07	27,94 \pm 7,42

Verificámos que, quando a estirpe selvagem é exposta a cobalto (II), os seus níveis de GSH diminuem 34% e os níveis de GSSG diminuem aproximadamente 82%. Na estirpe mutante *yap1* os níveis de GSH antes da exposição ao cobalto, apresentam menos 40% do conteúdo intracelular de GSH da estirpe selvagem. Quando o mutante *yap1* é submetido à presença de cobalto, os seus níveis de GSH diminuem 27% relativamente aos valores

obtidos na estirpe selvagem na presença de cobalto. O conteúdo de GSSG do mutante *yap1* é aproximadamente 44% menor que o da estirpe selvagem e, quando as células são expostas a cobalto (II), o seu conteúdo de GSSG diminui aproximadamente 64% (Tabela 3.2).

Os resultados obtidos neste ensaio demonstram que os níveis de GSH diminuem quando a célula é exposta à presença de cobalto. No entanto, os níveis de GSSG não aumentam, ao contrário do esperado (Herrero *et al.*, 2008) (Tabela 3.2). De acordo com os resultados de Kumar, *et al* o tripéptido GSH, para além do seu papel na resposta ao stress oxidativo, é principalmente essencial no metabolismo do ferro (Kumar *et al.*, 2011). Foi verificado que tanto o excesso como a escassez de GSH induzem uma resposta celular que mimetiza a privação de ferro, tendo sido proposto um papel preponderante desta molécula na regulação do metabolismo do ferro (Kumar *et al.*, 2011). Stadler *et al.*, demonstraram que a presença de cobalto na célula provoca uma resposta idêntica à verificada em privação de ferro (Stadler and Schweyen, 2002). Assim, uma possível justificação para os níveis de GSSG não aumentarem após 60 minutos de incubação com 2mM de CoSO₄ é, a possibilidade de todo o conteúdo celular de GSH estar a ser utilizado para manutenção da homeostase do ferro.

Os nossos resultados indicam que os níveis de GSH no mutante *yap1* são inferiores ao da estirpe selvagem (Figura 3.7 e Tabela 3.2) e também que os níveis de ferro são superiores no mutante (Figura 3.2). Assim, é possível que não só o stress oxidativo, mas também a diminuição dos níveis de GSH, e o consequente desequilíbrio da homeostase do ferro, contribuam para a sensibilidade do mutante *yap1* ao cobalto.

De forma a analisar se a diminuição do conteúdo de GSH poderia estar relacionado com a toxicidade do cobalto, monitorizámos o crescimento das estirpes selvagem e mutante *yap1* em meio sólido suplementado com 2mM de cobalto e/ou com 200µM ou 300µM de GSH (Figura 3.8)

Verificámos que, tanto a estirpe selvagem como a estirpe mutante *yap1* são mais resistentes à presença de CoSO₄ quando o meio é suplementado com 200 µM de GSH, sendo este efeito mais notório usando 300 µM de GSH (Figura 3.8). Ao fim de 72 horas de incubação em meio com droga e GSH, o mutante *yap1* não apresenta fenótipo de sensibilidade.

Capítulo 3 Resultados e Discussão

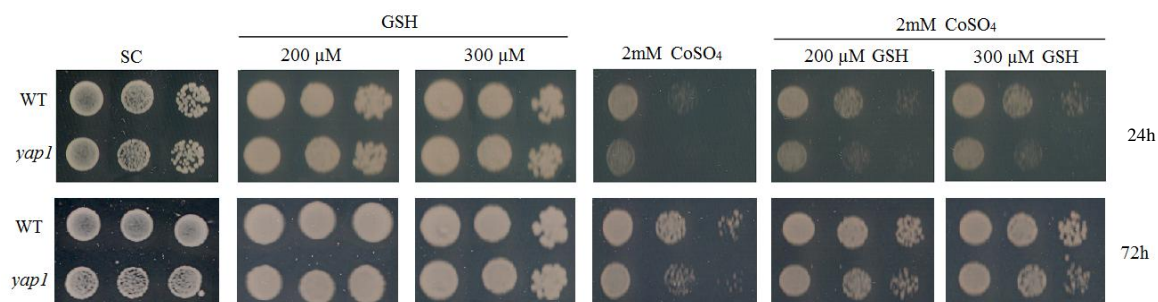


Figura3.8 A adição de GSH exógeno ao meio de cultura alivia a toxicidade do cobalto. As estirpes selvagem e mutante *yap1* cresceram em meio sólido completo sintético suplementado com 2mM de CoSO₄ e também na presença de 200 ou 300 μM de GSH. O crescimento das células foi registado depois de 24 e 72h de incubação a 30°C.

Estes resultados sugerem que o conteúdo intracelular de GSH disponível poderá desempenhar um papel determinante na toxicidade do cobalto e que a toxicidade no mutante *yap1* poder-se-á dever em parte à diminuição acentuada dos níveis de glutathione neste mutante, com o concomitante desequilíbrio da homeostase do ferro (Figura 3.2).

Capítulo 4

Conclusões e Perspectivas

Capítulo 4 Conclusões e Perspectivas

Neste trabalho verificámos que o factor de transcrição Yap1 desempenha um papel preponderante na resistência à intoxicação por cobalto, na levedura *Saccharomyces cerevisiae* (Figura 3.1). Foi verificado que o factor de transcrição Yap1 se liga directamente ao ião cobalto (II), acumulando-se no núcleo (Figura 3.3 e 3.4) activando, entre outros, vários genes envolvidos no controlo do stress oxidativo (Figura 3.5).

A presença de cobalto gera stress oxidativo muito severo na célula e verificou-se que na ausência do factor de transcrição Yap1 o stress oxidativo é ainda mais acentuado, aumentando os níveis de carbonilação das proteínas (Figura 3.6). Embora os níveis de cobalto no mutante *yap1* estejam diminuídos, os níveis de ferro estão aumentados (Figura 3.2) e este facto, em conjunto com a diminuição das defesas anti-oxidantes (Figura 3.5), deverá contribuir significativamente para o aumento dos danos oxidativos no mutante.

O Yap1 também controla a expressão do gene *GSH1* que codifica a primeira enzima da biosíntese da glutathione e que é induzido na presença de cobalto (Figura 3.7). Recentemente, foi demonstrado que a glutathione é uma molécula necessária para assegurar a homeostase do ferro e que apenas desempenha um papel importante no stress oxidativo, quando a via da tiorredoxina se encontra comprometida (Kumar *et al.*, 2011). Neste trabalho verificámos que ao fim 60 minutos de indução com CoSO_4 , os níveis de glutathione e da sua forma oxidada (GSSG) se encontram diminuídos, sugerindo que GSH poderá estar a ser limitante na célula. Esta hipótese é corroborada pelo facto de células da estirpe selvagem e mutante *yap1* serem mais resistentes à intoxicação pelo cobalto, quando o meio é suplementado com GSH (Figura 3.8).

De acordo com os resultados aqui apresentado e discutidos, propomos um modelo de acção do factor Yap1 no stress provocado pelo cobalto (Figura 4.1). Quando as células são sujeitas a grandes quantidades de cobalto o Yap1 participa na indução de vários genes implicados na defesa anti-oxidativa, inibindo deste modo a geração de ROS. Simultaneamente, o Yap1 também medeia o aumento da expressão do gene *GSH1*, e o consequente aumento da síntese de GSH, assegurando o “backup” à via da tiorredoxina e também a manutenção da homeostase do ferro.

No futuro, seria interessante determinar a concentração intracelular de cobalto e ferro nas estirpes selvagem e mutante tratadas com CoSO_4 e GSH. Paralelamente, como os níveis de ferro na estirpe mutante *yap1* são mais elevados (Figura 3.2), os níveis de expressão dos genes alvo de Aft1, o factor de transcrição envolvido na resposta a baixas

concentrações de ferro, poderão ser avaliados por qRT-PCR, de modo a averiguar o grau de comprometimento da homeostase do ferro neste mutante.

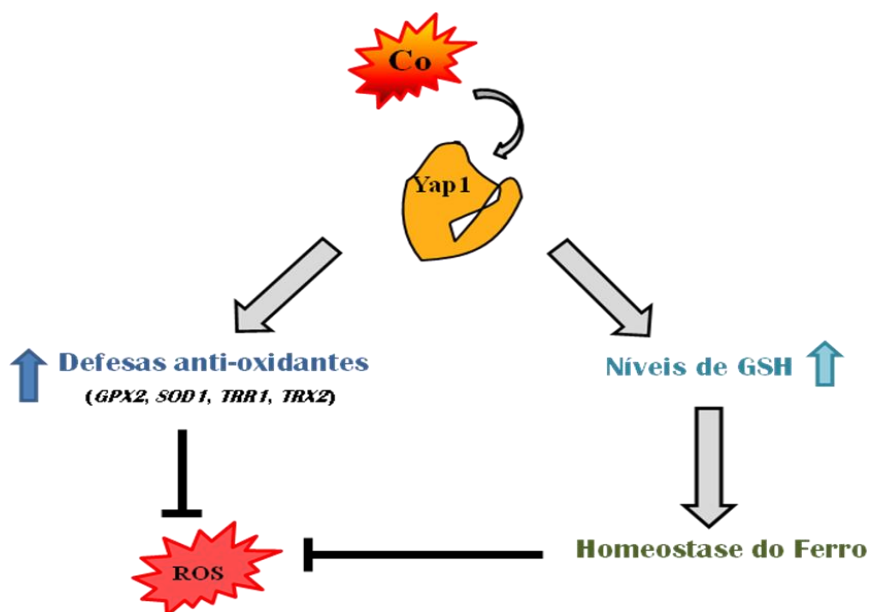


Figura 4.1 Representação esquemática do possível modelo de acção do Yap1 no controlo dos danos provocados por cobalto.

Os nossos resultados demonstram claramente que a disponibilidade de GSH na célula é importante para que esta sobreviva na presença de cobalto. A levedura tem a capacidade de sintetizar GSH ou de importar este tripéptido do meio exterior, através do transportador Opt1 (Bourbouloux *et al.*, 2000). Assim, seria interessante verificar se uma estirpe com a biossíntese e a importação de GSH comprometidas é mais sensível à presença de cobalto. Neste contexto, o duplo-mutante *yap1opt1*, deverá exibir uma maior sensibilidade ao tratamento com cobalto do que os respectivos mutantes simples.

Sabe-se que GSH pode formar complexos com alguns metais pesados tais como, arsénio, mercúrio, zinco, cobre, de uma forma não enzimática (Barycki, 2007). Durante os ensaios de HPLC realizados para medir os níveis de GSH e GSSG, verificou-se a existência de um pico não identificado. Seria pertinente verificar se, esse pico corresponde a um possível complexo entre GSH e cobalto.

Recentemente foi constatado que o cobalto afecta especificamente a actividade de duas enzimas mitocondriais com centros [4Fe-4S] (as enzimas aconitase e homoaconitase) (Gleason *et al.*, 2011). Um complexo GSH/Co poderia diminuir a concentração efectiva de

Capítulo 4 Conclusões e Perspectivas

cobalto dentro da célula e proteger essas enzimas. Assim, seria informativo testar a actividade destas enzimas em células expostas a cobalto em meio suplementado com GSH.

Pensa-se que o cobalto é armazenado no vacúolo e que o transportador Cot1 será importante nesse processo (Conklin *et al.*, 1992), no entanto este mecanismo ainda não foi completamente esclarecido. Em levedura, a proteína Ycf1, uma proteína ortóloga das proteínas MRPs, (Multi Drug Resistance Associated Proteins) de mamíferos, tem a capacidade de transportar metais conjugados com glutathione para o vacúolo (Rebber *et al.*, 1998). A possível associação da toxicidade do cobalto com os níveis de GSH torna tentador testar se Ycf1 poderá estar envolvida no armazenamento de cobalto no vacúolo.

Referências bibliográficas

- Altmann, K., M. Durr and B. Westermann (2007). "Saccharomyces cerevisiae as a model organism to study mitochondrial biology: general considerations and basic procedures." Methods Mol Biol **372**: 81-90.
- Alves, A. N. L. and H. V. D. Rosa (2003). "Exposição ocupacional ao cobalto: aspectos toxicológicos." Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences **39**(2): 129-139.
- Azevedo, D., F. Tacnet, A. Delaunay, C. Rodrigues-Pousada and M. B. Toledano (2003). "Two redox centers within Yap1 for H₂O₂ and thiol-reactive chemicals signaling." Free Radic Biol Med **35**(8): 889-900.
- Barycki, J. J. (2007). Antioxidant Molecules and Redox Cofactors.
- Berg, J., J. L. Tymoczko and L. Stryer (2003). Biochemistry, Freeman.
- Bourbouloux, A., P. Shahi, A. Chakladar, S. Delrot and A. K. Bachhawat (2000). "Hgt1p, a high affinity glutathione transporter from the yeast Saccharomyces cerevisiae." J Biol Chem **275**(18): 13259-13265.
- Coleman, S. T., E. Tseng and W. S. Moye-Rowley (1997). "Saccharomyces cerevisiae basic region-leucine zipper protein regulatory networks converge at the ATR1 structural gene." J Biol Chem **272**(37): 23224-23230.
- Conklin, D. S., J. A. McMaster, M. R. Culbertson and C. Kung (1992). "COT1, a gene involved in cobalt accumulation in Saccharomyces cerevisiae." Mol Cell Biol **12**(9): 3678-3688.
- Delaunay, A., A. D. Isnard and M. B. Toledano (2000). "H₂O₂ sensing through oxidation of the Yap1 transcription factor." EMBO J **19**(19): 5157-5166.
- Delaunay, A., D. Pflieger, M. B. Barrault, J. Vinh and M. B. Toledano (2002). "A thiol peroxidase is an H₂O₂ receptor and redox-transducer in gene activation." Cell **111**(4): 471-481.
- Dujon, B., D. Alexandraki, B. Andre, W. Ansorge, V. Baladron, J. P. Ballesta, A. Banrevi, P. A. Bolle, M. Bolotin-Fukuhara, P. Bossier and et al. (1994). "Complete DNA sequence of yeast chromosome XI." Nature **369**(6479): 371-378.
- Fernandes, L., C. Rodrigues-Pousada and K. Struhl (1997). "Yap, a novel family of eight bZIP proteins in Saccharomyces cerevisiae with distinct biological functions." Mol Cell Biol **17**(12): 6982-6993.
- Forsburg, S. L. (2001). "The art and design of genetic screens: yeast." Nat Rev Genet **2**(9): 659-668.
- Gasch, A. P. and M. Werner-Washburne (2002). "The genomics of yeast responses to environmental stress and starvation." Funct Integr Genomics **2**(4-5): 181-192.

- Gerberding, J. L. (2004). TOXICOLOGICAL PROFILE FOR COBALT. U. S. D. O. H. A. H. S.-P. H. S. A. f. T. S. a. D. Registry.
- Gietz, R. D. and R. H. Schiestl (1991). "Applications of high efficiency lithium acetate transformation of intact yeast cells using single-stranded nucleic acids as carrier." Yeast **7**(3): 253-263.
- Gleason, J. E., D. J. Corrigan, J. E. Cox, A. R. Reddi, L. A. McGinnis and V. C. Culotta (2011). "Analysis of Hypoxia and Hypoxia-Like States through Metabolite Profiling." PLoS One **6**(9): e24741.
- Grant, C. M., L. P. Collinson, J. H. Roe and I. W. Dawes (1996). "Yeast glutathione reductase is required for protection against oxidative stress and is a target gene for yAP-1 transcriptional regulation." Mol Microbiol **21**(1): 171-179.
- Gulshan, K., S. S. Lee and W. S. Moye-Rowley (2011). "Differential oxidant tolerance determined by the key transcription factor Yap1 is controlled by levels of the Yap1-binding protein, Ybp1." J Biol Chem **286**(39): 34071-34081.
- Herrero, E., J. Ros, G. Belli and E. Cabiscol (2008). "Redox control and oxidative stress in yeast cells." Biochim Biophys Acta **1780**(11): 1217-1235.
- Hinnebusch, A. G. (2005). "Translational regulation of GCN4 and the general amino acid control of yeast." Annu Rev Microbiol **59**: 407-450.
- Kand'ar, R., P. Zakova, H. Lotkova, O. Kucera and Z. Cervinkova (2007). "Determination of reduced and oxidized glutathione in biological samples using liquid chromatography with fluorimetric detection." J Pharm Biomed Anal **43**(4): 1382-1387.
- Kasprzak, K. S. (1991). "The role of the Oxidative Damage in Metal Carcinogenicity." American Chemical Society **4**(6): 604-615.
- Kelleher, P., K. Pacheco and L. S. Newman (2000). "Inorganic dust pneumonias: the metal-related parenchymal disorders." Environ Health Perspect **108 Suppl 4**: 685-696.
- Kuge, S. and N. Jones (1994). "YAP1 dependent activation of TRX2 is essential for the response of *Saccharomyces cerevisiae* to oxidative stress by hydroperoxides." EMBO J **13**(3): 655-664.
- Kuge, S., N. Jones and A. Nomoto (1997). "Regulation of yAP-1 nuclear localization in response to oxidative stress." EMBO J **16**(7): 1710-1720.
- Kumar, C., A. Igbaria, B. D'Autreaux, A. G. Planson, C. Junot, E. Godat, A. K. Bachhawat, A. Delaunay-Moisan and M. B. Toledano (2011). "Glutathione revisited: a vital function in iron metabolism and ancillary role in thiol-redox control." EMBO J **30**(10): 2044-2056.

- Li, L. and J. Kaplan (1998). "Defects in the yeast high affinity iron transport system result in increased metal sensitivity because of the increased expression of transporters with a broad transition metal specificity." J Biol Chem **273**(35): 22181-22187.
- Lindquist, S. and E. A. Craig (1988). "The heat-shock proteins." Annu Rev Genet **22**: 631-677.
- Lippi, G., M. Franchini and G. C. Guidi (2005). "Cobalt chloride administration in athletes: a new perspective in blood doping?" Br J Sports Med **39**(11): 872-873.
- Lippi, G., M. Franchini and G. C. Guidi (2006). "Blood doping by cobalt. Should we measure cobalt in athletes?" J Occup Med Toxicol **1**: 18.
- Lison, D., R. Lauwerys, M. Demedts and B. Nemery (1996). "Experimental research into the pathogenesis of cobalt/hard metal lung disease." Eur Respir J **9**(5): 1024-1028.
- Martens, J. H., H. Barg, M. J. Warren and D. Jahn (2002). "Microbial production of vitamin B12." Appl Microbiol Biotechnol **58**(3): 275-285.
- Morrissey, J., I. R. Baxter, J. Lee, L. Li, B. Lahner, N. Grotz, J. Kaplan, D. E. Salt and M. L. Guerinot (2009). "The ferroportin metal efflux proteins function in iron and cobalt homeostasis in Arabidopsis." Plant Cell **21**(10): 3326-3338.
- Mosser, D. D. and R. I. Morimoto (2004). "Molecular chaperones and the stress of oncogenesis." Oncogene **23**(16): 2907-2918.
- Nemery, B. and J. L. Abraham (2007). "Hard metal lung disease: still hard to understand." Am J Respir Crit Care Med **176**(1): 2-3.
- Nevitt, T. and C. Rodrigues-Pousada (2006). The Stress response in the budding yeast. Heat Shock Proteins in Biology and Medicine 2006. J. Radons and G. Multhoff, Research Signpost.
- Nystrom, T. (2005). "Role of oxidative carbonylation in protein quality control and senescence." EMBO J **24**(7): 1311-1317.
- Rebber, J. F., G. C. Connolly, M. E. Dumont and N. Ballatori (1998). "ATP-dependent transport of reduced glutathione on YCF1, the yeast orthologue of mammalian multidrug resistance associated proteins." J Biol Chem **273**(50): 33449-33454.
- Rodrigues-Pousada, C., R. A. Menezes and C. Pimentel (2010). "The Yap family and its role in stress response." Yeast **27**(5): 245-258.
- Rodrigues-Pousada, C., T. Nevitt and R. Menezes (2005). "The yeast stress response. Role of the Yap family of b-ZIP transcription factors. The PABMB Lecture delivered on 30 June 2004 at the 29th FEBS Congress in Warsaw." FEBS J **272**(11): 2639-2647.
- Rodrigues-Pousada, C. A., T. Nevitt, R. Menezes, D. Azevedo, J. Pereira and C. Amaral (2004). "Yeast activator proteins and stress response: an overview." FEBS Lett **567**(1): 80-85.

- Roesems, G., P. H. Hoet, D. Dinsdale, M. Demedts and B. Nemery (2000). "In vitro cytotoxicity of various forms of cobalt for rat alveolar macrophages and type II pneumocytes." Toxicol Appl Pharmacol **162**(1): 2-9.
- Rosenfeld, L., A. R. Reddi, E. Leung, K. Aranda, L. T. Jensen and V. C. Culotta (2010). "The effect of phosphate accumulation on metal ion homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*." J Biol Inorg Chem **15**(7): 1051-1062.
- Sherman, F. (2002). "Getting started with yeast." Methods Enzymol **350**: 3-41.
- Stadler, J. A. and R. J. Schweyen (2002). "The yeast iron regulon is induced upon cobalt stress and crucial for cobalt tolerance." J Biol Chem **277**(42): 39649-39654.
- Tan, K., H. Feizi, C. Luo, S. H. Fan, T. Ravasi and T. G. Ideker (2008). "A systems approach to delineate functions of paralogous transcription factors: role of the Yap family in the DNA damage response." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(8): 2934-2939.
- Toledano, M. B., A. Delaunay, L. Monceau and F. Tacnet (2004). "Microbial H₂O₂ sensors as archetypical redox signaling modules." Trends Biochem Sci **29**(7): 351-357.
- Wemmie, J. A., M. S. Szczypka, D. J. Thiele and W. S. Moye-Rowley (1994). "Cadmium tolerance mediated by the yeast AP-1 protein requires the presence of an ATP-binding cassette transporter-encoding gene, YCF1." J Biol Chem **269**(51): 32592-32597.
- Wheeler, G. L., E. W. Trotter, I. W. Dawes and C. M. Grant (2003). "Coupling of the transcriptional regulation of glutathione biosynthesis to the availability of glutathione and methionine via the Met4 and Yap1 transcription factors." J Biol Chem **278**(50): 49920-49928.
- Wu, A. L. and W. S. Moye-Rowley (1994). "GSH1, which encodes gamma-glutamylcysteine synthetase, is a target gene for yAP-1 transcriptional regulation." Mol Cell Biol **14**(9): 5832-5839.
- Yan, C., L. H. Lee and L. I. Davis (1998). "Crm1p mediates regulated nuclear export of a yeast AP-1-like transcription factor." EMBO J **17**(24): 7416-7429.